

ETUDE SUR L'AMÉLIORATION DES LIMITES DE QUANTIFICATION POUR L'ANALYSE DES RÉSIDUS MÉDICAMENTEUX DE LA DCE DANS LA PHASE AQUEUSE DES EAUX DE SURFACE

Amélioration des opérations d'analyses physico-chimiques

C. Chatellier, F. Lestremau
Octobre 2014

Programme scientifique et technique
Année 2013-2015

Rapport d'étape

Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme d'activité AQUAREF pour l'année 2013 dans le cadre du partenariat ONEMA - AQUAREF 2013, au titre de l'action D- Amélioration des opérations d'analyses physico-chimiques.

Auteur (s) :

Claudine Chatellier
INERIS
Claudine.chatellier@ineris.fr

Francois Lestremau
INERIS
francois.lestremau@ineris.fr

Sophie Lardy-Fontan
LNE
sophie.lardy-fontan@lne.fr

Philippe Bados
IRSTEA
philippe.bados@irstea.fr

Les correspondants

Onema : Pierre-François Staub, pierre-francois.staub@onema.fr

Etablissement : _ ONEMA

Référence du document : François LESTREMAU - Etude sur l'amélioration des limites de quantification pour l'analyse des résidus médicamenteux de la DCE dans la phase aqueuse des eaux de surface. p. 91

Droits d'usage :	<i>Accès libre</i>
Couverture géographique :	<i>International</i>
Niveau géographique :	<i>National</i>
Niveau de lecture :	<i>Professionnels, experts</i>
Nature de la ressource :	<i>Document</i>

1. GLOSSAIRE	11
2. INTRODUCTION	13
3. PARAMETRES ANALYTIQUES LC/MS/MS	17
3.1 Etalons internes	17
3.2 Paramètres de spectrométrie de masse.....	17
3.3 Séparation chromatographique	17
3.4 Performances de la méthode en injection liquide	19
4. ETUDE PAR EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE EN LIGNE (SPE-OL) ET OPTIMISATION DES PARAMÈTRES EXPÉRIMENTAUX	21
4.1 L'extraction sur phase solide en ligne (SPE-OL) – principe et revue bibliographique de l'application aux hormones estrogéniques.....	21
4.2 Cartouches SPE en ligne testées.....	23
4.3 Temps de rétention obtenus pour les différentes cartouches testées	24
4.4 Influence du pH du milieu de travail	27
4.5 Optimisation de la séparation chromatographique de la 17-alpha et 17-beta estradiol	30
4.6 Evaluation des performances des cartouches testées	32
Capacité d'extraction des cartouches.....	33
4.6.1 Limites de quantification et gamme de concentration	34
Gamme de travail.....	35
4.7 Influence du pourcentage de solvant dans l'Evian® et du volume de chargement sur la cartouche SPE-OL	35
5. EXTRACTION PAR SPE (HORS LIGNE)	39
5.1 Bruit de fond engendré par l'analyse d'eau d'evian® avec une cartouche HLB® ..	39
5.2 Taux de récupération des médicaments par extraction SPE HLB®	40
6. DOUBLE EXTRACTION : SPE (HORS LIGNE) SUIVIE DE SPE-OL	43
6.1 Rendements d'extraction par double pré-concentration	44
Analyses sur eau d'Evian®	44
Analyses sur l'eau de l'Oise	47
7. CONCLUSION	49
8. REFERENCES	51
9. LISTE DES ANNEXES	53

Liste des annexes :

Annexe 1 : Structure des composés étudiés

Annexe 2 : Paramètres de réglage du spectromètre de masse

Annexe 3-a : Méthode chromatographique en injection liquide

Annexe 3-b : Méthode chromatographique avec préconcentration SPE en ligne

Annexe 4 : Chromatogramme obtenu sur la colonne X-Bridge™ 2,1x150mm ; 3,5µm (Waters®)

Annexe 5 : Chromatogramme obtenu sur la colonne Kinetex® C18 2,1x100mm ; 2,6µm (Phenomenex®)

Annexe 6 : Chromatogramme obtenu avec l'injection des composés dans de l'eau MillQ ou d'Évian® dans les différentes cartouches SPE-OL testées

Annexe 7 : Profil du log D vs. pH pour l'ibuprofène

Annexe 8 : Méthode d'extraction des résidus médicamenteux par SPE-HLB® - (6cc-200mg)

Etude sur l'amélioration des limites de quantification pour l'analyse des résidus médicamenteux de la DCE dans la phase aqueuse des eaux de surface

Claudine Chatellier, Francois Lestremau

RESUMÉ

La directive 2013/39/CE, révision de la directive cadre eau publiée en 2013, a promulgué un élargissement de la liste des substances à surveiller dans les milieux aquatiques en y incluant de nouvelles familles de polluants. Les résidus médicamenteux n'ont pas été formellement inclus dans la liste de la révision de la DCE mais 3 substances, le diclofénac, le 17-bêta-estradiol et le 17-alpha-éthynylestradiol ont été placées sur une liste complémentaire de vigilance (« watch list »). La DCE a ainsi imposé que ces composés soient surveillés et contrôlés dans les eaux de surface européennes afin d'acquérir plus de données sur leur présence et leur devenir environnemental, en vue de leur éventuelle intégration dans la prochaine révision de la liste des substances prioritaires à surveiller.

Si la mesure du diclofénac au niveau de qualité environnemental (NQE, 100 ng/L) ne représente pas une difficulté particulière, les valeurs de NQE du texte publié en 2013 pour les 2 hormones estrogéniques sont extrêmement basses, respectivement à 400 pg/L pour le 17-bêta-estradiol et à 35 pg/L pour le 17-alpha-éthynylestradiol. Ainsi, la quantification de ces substances à ces teneurs devient particulièrement difficile.

L'objectif de cette étude a donc été de développer une méthode analytique qui pourrait atteindre les exigences de la QA/QC dans la phase aqueuse, en termes de sensibilité pour ces composés. D'autres hormones estrogéniques d'intérêt ainsi que le diclofénac et l'ibuprofène ont été inclus dans cette étude.

Les analyses ont été effectuées avec un chromatographe en phase liquide couplé à un spectromètre de masse en tandem (LC/MS/MS). Une méthode a d'abord été développée en extraction sur phase solide en ligne (SPE-OL). L'évaluation de différents supports d'extraction a permis d'établir que le support HLB® était le plus adapté à l'analyse des composés visés.

Avec ce mode d'analyse, la méthode chromatographique a dû être adaptée notamment pour obtenir la séparation entre le 17-alpha-estradiol et le 17-bêta-estradiol. Il a été démontré que le pH de l'eau est particulièrement important pour l'analyse de composés comportant des groupements ionisables (en particulier les fonctions acides du diclofénac et de l'ibuprofène).

Afin d'abaisser les limites de quantification, l'injection par SPE-OL couplée à la LC/MS/MS a été effectuée sur un extrait obtenu par le passage d'un large volume d'échantillon (1L) par extraction sur phase solide (SPE). Les tests ont d'abord été menés sur une matrice simple d'eau de source (Evian®). Des limites de quantification très basses (~10 pg/L) n'ont pas pu être obtenues à cause du bruit de fond engendré en LC/MS/MS provenant des cartouches HLB®. Des résultats encourageants ont été obtenus sur des concentrations à partir de 80 pg/L pour la plupart des hormones estrogéniques, le diclofénac et l'ibuprofène.

Par contre, les tests effectués avec une matrice plus complexe (eau de surface) n'ont pas permis d'obtenir des résultats probants. En effet, les effets de matrices plus prononcés dans ce milieu ont produit un bruit de fond important qui n'a pas permis la mesure des composés étudiés à des niveaux de concentrations compatibles avec les exigences DCE et QA/QC.

Mots clés (thématique et géographique) :

Hormones estrogéniques, résidus médicamenteux, phase aqueuse, SPE en ligne, LC/MS/MS

Study about the improvement of quantification limits for the analysis of pharmaceutical compounds targeted by the WFD in the aqueous phase of surface water

Claudine Chatellier, Francois Lestremau

ABSTRACTS

The revision of the water framework directive (WFD), published in 2013, has promoted some family of compounds that had not been initially included in the priority list for the monitoring in aquatic environment. Pharmaceutical compounds have not been formally included in the revision of the priority list of WFD but 3 substances: diclofenac, 17-beta-estradiol and 17-alpha-ethinylestradiol have been positioned in a secondary "watch list". The WFD therefore indicated that these substances should be monitored in European surface waters in view of gaining knowledge about their environmental presence, to eventually include them for the next update of the priority list.

If the measurement of diclofenac does not represent a particular difficulty at the level defined by the Environmental Quality Standard (EQS) (at 100 ng/L), in the 2013 document, the NOE for the 2 estrogenic hormones have been set at an extremely low level, respectively at 400 pg/L for 17-beta-estradiol and 35 pg/L for 17-alpha-ethinylestradiol. Therefore, the determination of these substances at this level is extremely challenging.

This study was focused to develop, in the aqueous phase, an analytical method which could achieved the requirement of the QA/QC in term of sensibility for the measure of these compounds. Other hormones, diclofenac and ibuprofen have also been included in the study.

The analyses were carried out using a liquid chromatography system coupled to tandem mass spectrometry detection (LC/MS/MS). A method was first developed based on on-line solid phase extraction (SPE). Test of various SPE cartridges indicated that the HLB® phase was the most suitable for the analysis of targeted components.

With this mode of analysis, the chromatographic method has been adapted particularly to obtain the separation of 17-beta-estradiol from 17-alpha-estradiol. It has been determined that the pH of the water samples was critical for the analysis of compounds including ionisable group, in this case acid function for diclofenac and ibuprofen.

To lower quantification limits of the method, injection by SPE on line coupled to LC/MS/MS was associated to the extraction of a large volume of sample (1L) by SPE. Tests were preliminary carried out using a clean matrix: Evian® water. Low limits of quantification (~10 pg/L) could not be achieved due to high background LC/MS/MS noise originating from HLB® cartridges. Encouraging results were however obtained from 80 pg/L level for most of the tested hormones, diclofenac and ibuprofen.

Tests performed on a more representative matrix for surface water were not successful. Severe matrix effects were produced notably a dramatic increase of the background noise that prevented the determination of the studied compounds at the required level of the QA/QC and WFD.

Key words (thematic and geographical area) :

Estrogens, pharmaceutical compounds, aqueous phase, on-line SPE, LC/MS/MS

PRÉAMBULE

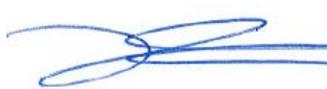
Le présent rapport a été établi sur la base des informations fournies à l'INERIS, des données (scientifiques ou techniques) disponibles et objectives et de la réglementation en vigueur.

La responsabilité de l'INERIS ne pourra être engagée si les informations qui lui ont été communiquées sont incomplètes ou erronées.

Les avis, recommandations, préconisations ou équivalent qui seraient portés par l'INERIS dans le cadre des prestations qui lui sont confiées, peuvent aider à la prise de décision. Etant donné la mission qui incombe à l'INERIS de par son décret de création, l'INERIS n'intervient pas dans la prise de décision proprement dite. La responsabilité de l'INERIS ne peut donc se substituer à celle du décideur.

Le destinataire utilisera les résultats inclus dans le présent rapport intégralement ou sinon de manière objective. Son utilisation sous forme d'extraits ou de notes de synthèse sera faite sous la seule et entière responsabilité du destinataire. Il en est de même pour toute modification qui y serait apportée.

L'INERIS dégage toute responsabilité pour chaque utilisation du rapport en dehors de la destination de la prestation.

	Rédaction	Vérification	Approbation
NOM	Claudine CHATELLIER François LESTREMAU	Olivier AGUERRE- CHARIOL	Nicolas ALSAC
Qualité	Technicien et Ingénieur à l'Unité « Innovation pour la Mesure » Direction des Risques Chroniques	Responsable de l'Unité « Innovation pour la Mesure » Direction des Risques Chroniques	Responsable du Pôle « Caractérisation de l'Environnement » Direction des Risques Chroniques
Visa			

1. GLOSSAIRE

ACN	: Acétonitrile,
AINS	: Anti-inflammatoire non stéroïdiens,
DCE	: Directive Cadre sur l'Eau,
E1	: Estrone,
E2	: Estradiol,
17a-E2	: 17-alpha-estradiol,
17b-E2	: 17-bêta-estradiol,
E3	: Estriol,
EE2	: 17-alpha-éthynylestradiol,
ESI	: Ionisation par électrospray,
K _{ow}	: Coefficient de partition octanol/eau,
LC	: Chromatographie à phase liquide,
LD	: Limite de détection,
LQ	: Limite de quantification,
MIP	: Polymères à empreinte moléculaire,
MRM	: Acquisition en mode de réaction multiple (multiple reaction monitoring),
MS	: Spectrométrie de masse,
MS/MS	: Spectrométrie de masse en tandem
NQE	: Norme de qualité environnementale,
SPE	: Extraction sur phase solide (solid phase extraction),
SPE-OL	: Extraction sur phase solide en ligne.

2. INTRODUCTION

La Directive Cadre Eau (DCE) [1] a été élaborée au début des années 2000 sur la base des connaissances disponibles à cette époque. Ainsi, 41 composés ont été intégrés dans cette liste du fait de leur toxicité avérée pour les milieux aquatiques.

Ces composés, hormis les métaux, sont majoritairement hydrophobes comme les polydibromophényléthers, hydrocarbures aromatiques polycycliques ou certains pesticides. Les méthodes analytiques étaient principalement adaptées pour la détection de ce type de composés.

Depuis une dizaine d'année, l'évolution technologique, notamment le développement d'appareils couplant la chromatographie en phase liquide avec la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS), a permis de mettre en évidence la présence quasi-systématique de nombreux autres polluants, non considérés par la législation, dans les milieux aquatiques.

Tous ces composés sont rassemblés sous l'appellation « polluants émergents ». Parmi ceux-ci, les résidus médicamenteux peuvent être particulièrement distingués de par le nombre de substances potentielles (plus de 5000) et de par leur présence importante dans les cours d'eau à des concentrations parfois supérieures au µg/L.

En France, de nombreux plans d'action visant à obtenir une meilleure connaissance de leur présence dans les cours d'eau ont été lancés, comme l'étude prospective organisée sous l'égide de l'ONEMA en 2012-2013, de l'ANSES en 2011 [2], dans le cadre du plan micropolluants (2010-2013) [3] ou le plan national sur les résidus de médicaments dans les eaux en 2011 [4].

Au niveau européen, la révision de la directive cadre eau a été publiée en Août 2013 [5]. Cette révision inclut désormais une quinzaine de substances supplémentaires. Les résidus médicamenteux occupent une place particulière puisqu'ils n'ont pas été formellement inclus dans la liste de substances prioritaires de la révision de la DCE. La DCE a cependant imposé qu'un plan d'action spécifique soit mis en place.

Cela implique que ces substances devront être surveillées et contrôlées dans les eaux de surface européennes afin d'acquérir plus de données sur leur présence et leur cinétique environnementale, dans l'éventualité d'être intégrées lors de la prochaine révision de la liste des substances prioritaires à surveiller.

3 substances en particulier ont été nommément identifiées et des valeurs de niveaux de qualité environnementales (NQE) définies dans le texte de 2013:

- Le diclofénac (NQE = 0,1 µg/L ou 100 ng/L) (anti-inflammatoire)
- Le 17-bêta-estradiol (NQE = $4 \cdot 10^{-4}$ µg/L ou 0,4 ng/L ou 400 pg/L) (hormone estrogénique naturelle)
- Le 17-alpha-éthynylestradiol (NQE= $3,5 \cdot 10^{-5}$ µg/L ou 0,035 ng/L ou 35 pg/L) (hormone estrogénique synthétique)

Si la mesure du diclofénac à la NQE ne représente pas une difficulté particulière, les valeurs de NQE pour les 2 hormones estrogéniques sont extrêmement basses. Ainsi, la quantification de ces substances à ces teneurs devient particulièrement difficile, d'autant plus qu'avec la directive QA/QC, cela implique une limite de quantification à NQE/3 avec 60% d'incertitudes élargies à la NQE.

L'essai interlaboratoire sur les résidus médicamenteux (incluant notamment, le diclofénac et les hormones estrone, 17-alpha éthinylestradiol, et 17-beta estradiol) organisé en 2012 par Aquaref a démontré la difficulté des laboratoires à maîtriser l'analyse de ces composés [6]. Les limites de quantification revendiquées par les laboratoires pour ces composés s'établissaient entre 1 et 100 ng/L.

Une fiche méthode MA-12 relative à la mesure de ces hormones [7], dérivée d'une publication de Miège *et al.* [8], avait été publiée par Aquaref en 2009. La méthode, mettant en œuvre l'extraction sur phase solide (SPE) et l'analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem avait permis d'atteindre des limites de quantification pour les eaux de surface respectivement de 600 et 1200 pg/L pour le 17-bêta-estradiol et le 17-alpha-éthinylestradiol. Ces limites de quantification (LQ) ne sont cependant pas suffisantes pour atteindre les exigences de la DCE.

Différentes approches peuvent être utilisées afin d'améliorer les LQ. La plus simple réside dans la préconcentration de l'extrait à de très petits volumes. Ainsi, pour la fiche méthode MA-12, l'extrait était concentré à sec puis repris par un volume de 200 µL. La reprise par un volume inférieur peut être difficile techniquement car il n'est plus assuré que l'on puisse dissoudre les composés cibles dans un tel volume. De plus, la concentration porte sur toute la matrice, ce qui peut entraîner des interférences lors de l'analyse chromatographique ou de la détection en raison d'inhibitions de signal.

Ainsi, une approche alternative, basée sur la SPE en ligne, a été testée et est présentée dans ce document. Le couplage de cette technique avec la LC/MS/MS permet d'éviter une reconcentration de l'extrait ce qui facilite le traitement d'échantillon. L'autre avantage majeur de ce mode est que la totalité de la quantité de composés piégés sur la cartouche est injectée dans le système chromatographique et atteint, en théorie, le détecteur. Ainsi, généralement, il suffit de beaucoup moins d'échantillon pour atteindre des performances acceptables en termes de sensibilité.

A titre d'exemple, considérons 1L d'échantillon traité par SPE (« hors ligne »), avec l'extrait obtenu re-concentré à 500 µL. Sur ces 500 µL, généralement seuls 10 µL sont analysés, ce qui représente dans ce cas 2% de ce qui était contenu dans l'échantillon. Avec de la SPE en ligne, comme la totalité de ce qui est contenu dans l'échantillon atteint (en théorie) le détecteur, il suffit d'extraire 2 % de 1 L soit 20 mL pour atteindre les mêmes performances qu'en SPE (« hors ligne »).

La SPE en ligne a été évaluée pour la mesure des hormones estrogéniques dans les eaux de surface et de traitement des eaux résiduaires urbaines dans différents articles [9-14]. Différentes natures de phase ont été testées avec succès (rendements voisins de 100 %).

Afin d'essayer de pouvoir atteindre les NQE préconisées par la DCE, des essais ont été menés avec une approche innovante visant à coupler les 2 types d'extraction sur phase solide, en hors ligne et en ligne. En effet, les analyses sont généralement effectuées en utilisant un mode ou l'autre mais jamais en combinées.

Or, en théorie, cette approche devrait pouvoir permettre d'abaisser significativement les limites de quantification atteignables. Ainsi, la première extraction permettra d'obtenir d'un volume d'échantillon large (1L) une concentration des composés contenus dans l'échantillon dans un extrait.

Ensuite, cet extrait sera injecté dans le système de SPE en ligne afin d'éviter un effet de fractionnement et de pouvoir amener la totalité de ce qui est présent dans l'échantillon jusqu'au détecteur.

Ce développement analytique s'est focalisé sur les substances visées par la DCE ainsi que sur des composés de la même famille chimique. Ainsi, les composés suivants ont été étudiés (les structures moléculaires sont exposées en annexe 1) :

- Les hormones estrogéniques : 17-bêta-estradiol (code SANDRE 5397), 17-alpha-éthinyloestradiol (2629), estriol (6446), 17-alpha-estradiol (5399), estrone (5396)
- Des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) : diclofénac (5349) et ibuprofène (5350)

La première partie visera donc à développer la partie séparation chromatographique et spectrométrique. La deuxième partie s'intéressera à l'optimisation des paramètres d'extraction par SPE en ligne notamment dans l'optique du passage d'un extrait contenant une certaine quantité de solvant. Enfin, la dernière partie présentera les résultats obtenus pour le couplage des 2 types d'extraction.

3. PARAMETRES ANALYTIQUES LC/MS/MS

3.1 ETALONS INTERNES

Pour des analyses par SPE/LC/MS/MS, des étalons internes marqués aux isotopes stables (de H et de C) doivent être de préférence utilisés afin de pouvoir s'affranchir de variations lors de l'extraction (rendements) et/ou lors de la détection (effets de matrice).

Lorsque cela était possible en fonction de leur disponibilité commerciale et de leur coût, il a été choisi d'utiliser des étalons marqués en ^{13}C car ceux-ci sont moins sujets à des phénomènes d'échanges D-H en milieu aqueux et leur comportement est plus représentatif que celui des étalons marqués deutériés.

La liste des étalons internes utilisés par composé est présentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Liste des étalons isotopiquement marqués utilisés pour cette étude

Composés	Etalons internes
17-bêta-estradiol	17-bêta-estradiol- $^{13}\text{C}_2$
17-alpha-estradiol	17-bêta-estradiol- $^{13}\text{C}_2$
17-alpha-éthinyloestradiol	17-alpha-éthinyloestradiol- $^{13}\text{C}_2$
Estriol	Estrone- $^{13}\text{C}_2$
Estrone	Estrone- $^{13}\text{C}_2$
Diclofénac	Diclofénac - $^{13}\text{C}_6$
Ibuprofène	Ibuprofène- d_3

3.2 PARAMÈTRES DE SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Les paramètres de spectrométrie de masse pour les composés cibles et les étalons internes ont été optimisés pour notre instrument. Pour les hormones estrogéniques, ils sont proches (mêmes transitions et mode d'ionisation par ESI(-)) de ceux décrits dans la fiche méthode Aquaref MA-12 [7].

Pour les AINS, selon la norme expérimentale XP 90-223 [15], le diclofénac peut être analysé en mode électrospray (ESI)-négatif. Ainsi, des tests d'infusion ont permis de définir les conditions de détection spectrométrique du diclofénac et de l'ibuprofène en ESI négatif.

Les paramètres de détection par spectrométrie de masse sont présentés en annexe 2.

3.3 SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

Les conditions chromatographiques définies pour des injections liquides ont été reproduites à l'identique de la fiche méthode Aquaref MA-12 [7]. Ces conditions sont détaillées en annexe 3-a.

L'utilisation de la SPE en ligne produit souvent un élargissement des pics chromatographiques par rapport à une analyse par injection liquide. Ainsi, la résolution des 2 isomères 17-alpha et 17-bêta estradiol devait être la plus importante possible car, ayant la même signature spectrométrique, seule la séparation chromatographique permet de les différencier.

Ainsi, 2 colonnes chromatographiques ont été testées :

- la colonne X-Bridge™ C₁₈ 2,1x150 mm ; 3,5 µm (Waters®), colonne utilisée dans la fiche méthode Aquaref MA12
- la colonne Kinetex® C₁₈ 2,1x100 mm ; 2,6 µm (Phenomenex®)

La colonne chromatographique Kinetex® a été choisie car elle est constituée d'une technologie plus récente et différente (solid core) que la colonne X-Bridge™ et donc que ses performances sont en théorie supérieure.

Dans un premier temps les analyses ont été réalisées par injection directe de solutions préparées dans un mélange acétonitrile/eau (40/60 ; v/v).

A gradient et température de four à colonne identiques, l'ordre d'élution des composés selon la colonne est le suivant :

Tableau 2 : Ordre d'élution des composés en fonction de la colonne

	Estriol	17-bêta-estradiol	17-alpha-estradiol	17-alpha-éthinyloestradiol	Estrone	Diclofénac	Ibuprofène
	Temps de rétention (min)						
X-Bridge™-C ₁₈	2.4	6.0	6.4	6.5	6.8	7.0	7.8
Kinetex®- C ₁₈	1.5	4.1	4.7	5.2	5.3	6.0	6.3

Avec un gradient identique, la colonne Kinetex®-C₁₈ présente moins de rétention pour tous les composés que la colonne X-Bridge™-C₁₈ (Tableau 2 et chromatogrammes en annexes 3 et 4). Cependant, pour la séparation chromatographique des 2 isomères : 17-bêta-estradiol et 17-alpha-estradiol, une meilleure sélectivité avec une séparation à la ligne de base est obtenue avec la colonne Kinetex®- C₁₈ (Figure 1).

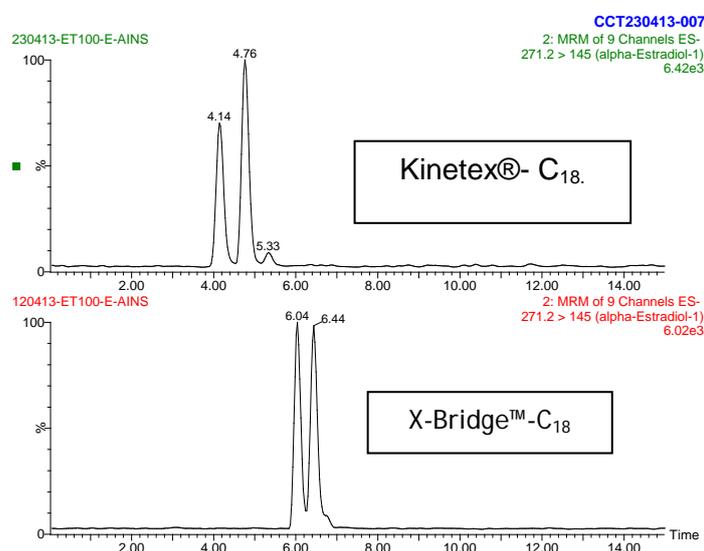


Figure 1: Comparaison de la séparation chromatographique des 2 isomères 17- bêta et alpha-estradiol selon la colonne testée

De ce fait, la colonne Kinetex®-C₁₈ a été choisie pour la suite de l'étude.

3.4 PERFORMANCES DE LA MÉTHODE EN INJECTION LIQUIDE

Les domaines de linéarité et limites de capabilité instrumentale (estimées par signal sur bruit = 10 sur la transition de quantification) obtenus avec le couplage colonne Kinetex®-C₁₈-MS/MS sont présentés dans le *Tableau 3* :

Tableau 3 : Domaines de linéarité et limites de quantification de capabilité instrumentales

	Domaine linéarité (ng/ml)	Limites instrumentales (ng/ml)
17-bêta-estradiol	10-550	10
17-alpha-estradiol	10-220	10
17-alpha-ethinylestradiol	10-220	10
Estrone	5-530	5
Estriol	5-510	5
Ibuprofène	2-200	2
Diclofénac	1-510	1

L'injection liquide sur notre système LC/MS/MS permet d'atteindre des LOQ estimées comprises entre 1 et 10 ng/mL.

4. ETUDE PAR EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE EN LIGNE (SPE-OL) ET OPTIMISATION DES PARAMÈTRES EXPÉRIMENTAUX

4.1 L'EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE EN LIGNE (SPE-OL) – PRINCIPE ET REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DE L'APPLICATION AUX HORMONES ESTROGÉNIQUES

L'abréviation SPE-OL sera utilisée dans le reste du document pour désigner l'extraction sur phase solide en ligne afin de la différencier de la SPE (extraction sur phase solide hors ligne). Le matériel de préconcentration associé est désigné par l'appellation cartouche SPE-OL pour le distinguer de la cartouche SPE utilisée en mode hors ligne.

L'extraction par phase solide (SPE) est une méthode de pré-concentration d'échantillon. Les composés cibles contenus dans l'échantillon sont piégés sur une cartouche contenant un adsorbant. Ils sont ensuite élués par un solvant approprié, reconcentrés (typiquement à 1 mL) avant d'être injectés dans l'appareil chromatographique. Cette dernière étape d'injection entraîne un fractionnement des substances captées sur la SPE. Ainsi, seulement une fraction de cet extrait (généralement quelques μL sur le 1 mL d'extrait obtenu) est injectée.

La SPE en ligne (SPE-OL) permet de connecter directement une cartouche de préconcentration SPE à un chromatographe en phase liquide. Les composés sont piégés sur une cartouche contenant un adsorbant et élués directement par la phase mobile. L'avantage de cette technique, outre son caractère automatisable qui permet de réduire les nombreuses étapes de préparation d'échantillon effectuées en SPE (hors ligne), repose sur le fait que 100 % des substances captées est analysé (en considérant 100 % de rendement d'extraction sur la cartouche).

Pour notre système, un volume d'échantillon généralement de 1,5 mL est directement injecté dans le système de pré-concentration de SPE en ligne au débit de 2 mL/min. Les composés d'intérêt piégés sur la colonne SPE sont ensuite élués en « back-flush » (désorption en sens inverse de celui du chargement) par la phase mobile utilisée dans les conditions chromatographiques habituelles d'analyse. Le principe est expliqué plus en détails en annexe 3b.

Comme souligné en introduction, la difficulté analytique pour cette étude réside particulièrement dans l'analyse des hormones estrogéniques. L'utilisation de la SPE en ligne a déjà été décrite dans quelques publications pour ces substances [9-14]. Les principales caractéristiques techniques de ces études sont récapitulées dans le Tableau 4.

Tableau 4 Revue bibliographique de l'analyse des hormones estrogéniques par SPE en ligne (repris de [9])

Composé	Volume d'échantillon (mL)	Matrice	Cartouche utilisée	Détection	LD (ng/L)	Rendements (%)	référence
E1, E2, E3, EE2	250	Eau de rivière, de boisson	PLRP-s	LC-MS/MS (ESI)	0,01-0,38	74-90	[10]
E1, E2, E3	50	Eau de rivière, de lac	Filtre de cigarette, C ₁₈	LC/UV	1 - 80	85-112	[13]
E1, E2, E3, EE2	1	Eau de surface, de STEP	Hypersil Gold C ₁₈	LC-MS/MS (APPI)	3-50	75-103	[14]
E1, E2, EE2	1	Eau de STEP	Dérivation sur support HLB®	LC-MS/MS (ESI)	0,4 – 0,7	80 - 95	[12]
E1, E2, E3, EE2	200	Eau de boisson, souterraine, de surface, de STEP	PLRP-s	LC/UV	10 -20	96- 111	[11]
E1, E2, E3, EE2	50	Eau de rivière, de STEP	NG1	LC-MS/MS (ESI)	0,1 -25	32 - 120	[9]

E1 = Estrone ; E2= 17-alpha et 17-bêta estradiol ; E3= Estriol ; EE2= 17-alpha-éthynylestradiol ; LD : limites de détection

Aucune tendance ne se dégage clairement quant au choix du type de support d'extraction. Viglino *et al.* [14] ont indiqué avoir utilisé une étape de dérivation directement sur la cartouche SPE afin d'améliorer la sensibilité de la méthode. Au vu des résultats obtenus par les autres études pour les limites de performance sans cette étape, il ne semble pas indispensable de procéder à une dérivation.

4.2 CARTOUCHES SPE EN LIGNE TESTÉES

Comme la littérature ne permet pas d'identifier clairement un support majoritairement utilisée et que, de plus, cette analyse vise aussi à inclure le diclofénac et l'ibuprofène, plusieurs cartouches de SPE-OL avec des caractéristiques différentes ont été testées :

- Lichrospher®-RP8-ADS, 25 µm de taille de particule, 25 x 4,0 mm (longueur * diamètre interne) (Merck référence 1.50209)

Cette cartouche est constituée de matériaux semblables à ceux employés pour les colonnes chromatographiques de phase inverse C₈. Ainsi, la nature de la phase est de la silice greffée avec des chaînes alkyles en C₈. Cette phase a subi un traitement d'endcapping afin de neutraliser les groupements silanols. La phase C₈ est adaptée à la rétention de composés plutôt apolaires.

- Synergi™-Fusion-RP, 2,5 µm, 20 x 2 mm (Phenomenex référence 00M-4423-B0-CE)

Cette cartouche est à base de silice greffée. Les greffons sont des chaînes en C₁₈ dans lesquelles est inclus un groupement polaire. Ainsi, les interactions avec les composés semi-polaires tel que les hormones estrogéniques devraient être augmentées.

Cette cartouche contient des particules de tailles beaucoup plus petites que les autres cartouches (2,5 µm au lieu de 25 ou 30 µm). Ainsi, elle génère beaucoup plus de pression (60 bar à 0,5 ml/min alors que les autres cartouches produisent 20 bars à 2 mL/min). Afin de ne pas mettre le système en surpression, le chargement a donc été effectué à 0,5 mL/min en augmentant la durée de chargement de 2 min (ce qui ne devrait pas modifier les performances analytiques).

- HLB®, 25 µm, 20 x 3,0 mm (Waters OASIS référence 186002039)

Le matériau HLB® est à base polymérique. Comparé aux cartouches de silice, il peut être utilisé à des pH plus extrêmes (notamment pour des pH basiques). De plus, il présente à la fois un caractère hydrophile et lipophile comme cela peut être observé sur sa formule développée :

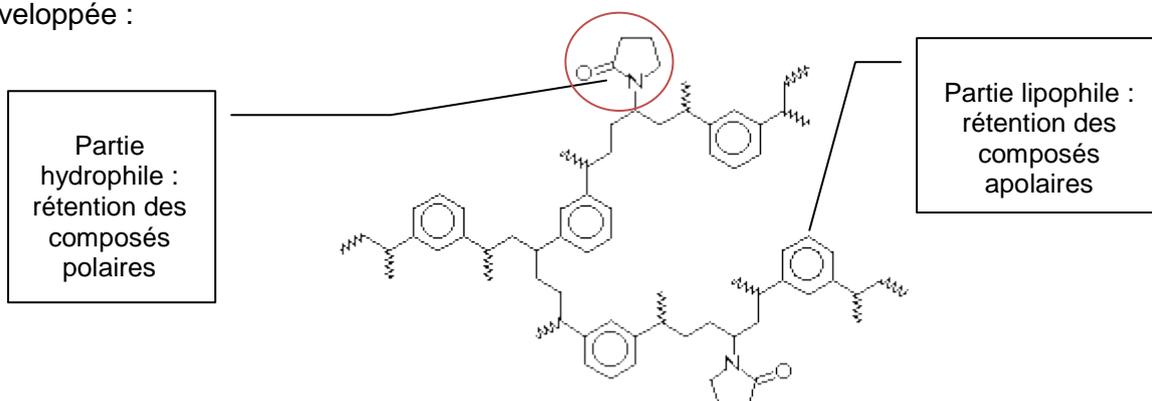


Figure 2 : Structure de la maille du polymère HLB®

Il est composé d'un copolymère en divinylbenzène (partie lipophile) et N-vinylpyrrolidone (partie hydrophile).

Sa partie lipophile permet de retenir les composés de faible polarité et son côté hydrophile de retenir les composés polaires ; de plus, ses groupements phényle permettent d'obtenir des interactions de type π - π . Il est ainsi utilisable pour des composés présentant une large gamme de polarité.

- Strata™-X, 25 μ m, 20 x 2,0 mm (Phenomenex référence 00M-S033-B0-CB)

Cette cartouche présente de nombreuses similarités avec la cartouche HLB® car c'est également un co-polymère avec une partie lipophile et une partie hydrophile. Le groupement polaire est identique (N-vinylpyrrolidone) mais la partie lipophile est légèrement différente comme cela peut être constaté sur la figure ci-dessous.

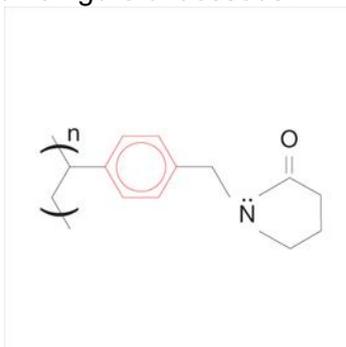


Figure 3 : Structure de la maille du polymère Strata™-X

- Polyclean™ 302H Upti-Trap, 30 μ m, 40 x 1,5 mm (Interchim reference 302H/1540TR)

Cette cartouche est à base polymérique mixte lipophile/hydrophile. Aucune autre information n'a pu être collectée sur nature de la phase qui la compose.

4.3 TEMPS DE RÉTENTION OBTENUS POUR LES DIFFÉRENTES CARTOUCHES TESTÉES

Les 5 cartouches ont été testées avec le mélange d'hormones estrogéniques et d'AINS. L'influence du milieu d'injection a été évaluée en préparant les solutions dans de l'eau MilliQ® et de l'eau d'Evian®.

Les temps de rétention ont été comparés pour les tests avec l'eau MilliQ® (Tableau 5) et pour l'eau d'Evian® (Tableau 6).

Tableau 5. Comparaison des temps de rétention obtenus pour des tests avec de l'eau MilliQ®

	Estriol	17-bêta-estradiol	17-alpha-estradiol	17-alpha-éthinylestadiol	Estrone	Diclofénac	Ibuprofène
Lichrospher®-RP8	9,19	10,58	10,75	10,85	10,97	9,59 (pic large)	10,77
HLB®	8,85	10,41	10,55	10,65	10,79	9,16 (pic large)	9,91
Polyclean™302H	9,11	10,59	10,76	10,83	10,97	9,50 (pic large) + interférent à 10,2	10,50 (pic large)
Synergi™-Fusion-RP	10,40	11,90	12,10	Non détecté	12,30	12,30	12,80
Strata™-X	8,60	10,15	10,30	10,40	10,50	9,60 (pic large)	10,80 (pic large)

Tableau 6. Comparaison des temps de rétention obtenus pour des tests avec de l'eau d'Evian®

	Estriol	17-bêta-estradiol	17-alpha-estradiol	17-alpha-éthinyloestradiol	Estrone	Diclofénac	Ibuprofène
Lichrospher®-RP8	9,20	10,57	10,74	10,83	10,94	Double pic 9,14+ 9,54	9,66
HLB®	8,85	10,41	10,55	10,63	10,77	8,91	9,44
Polyclean™302H	9,08	10,62	10,76	10,83	10,95	Double pic 9,14+ 9,54	9,44
Synergi™-Fusion-RP	10,40	11,90	12,10	12,20	12,30	10,0	10,10
Strata™-X	8,60	10,15	10,30	10,40	10,55	8,90	9,64

Pour une même matrice testée, des différences importantes de temps de rétention peuvent être observées pour un même composé suivant la cartouche testée. Cela est particulièrement marqué pour l'estriol qui présente un temps de rétention autour de 8,70 min pour les cartouches polymériques HLB® et Strata™-X, de 9,08 min pour l'autre cartouche polymérique Polyclean™302H alors que les cartouches en silice greffée de groupements apolaires présentent les rétentions les plus élevées avec respectivement 9,20 et 10,40 min. Pour les autres composés, cette différence est atténuée à l'exception de la cartouche Synergi™-Fusion-RP qui présente des temps de rétention systématiquement plus importants que pour les autres cartouches, en partie explicable par des temps de chargement plus long.

Les variations observées peuvent refléter les différentes interactions se produisant entre les cartouches et les composés cibles.

La comparaison des 2 milieux de tests, l'eau MilliQ et l'eau d'Evian® permet de constater que pour les hormones estrogéniques, des temps de rétention identiques sont obtenus. Pour le diclofénac et l'ibuprofène, des différences importantes sont observées : temps de rétention et forme des pics chromatographiques (non gaussiens) entre les 2 milieux. Les pics dans l'eau MilliQ sont particulièrement difformes particulièrement pour les cartouches HLB® et Strata™-X avec des largeurs de pics de plusieurs minutes.

Systématiquement, pour toutes les cartouches testées, les temps de rétention sont plus courts avec l'eau Milli Q qu'avec l'eau d'Evian®.

Un pic interférant est également systématiquement observé sur toutes les cartouches et pour les 2 milieux à côté du pic du diclofénac.

Un exemple de chromatogramme obtenu pour l'analyse des composés visés par analyse avec la cartouche Strata™-X et en particulier pour l'ibuprofène et le diclofénac est présenté en Figure 4 et Figure 5. Les chromatogrammes correspondant aux autres cartouches testées sont présentés en annexe 6.

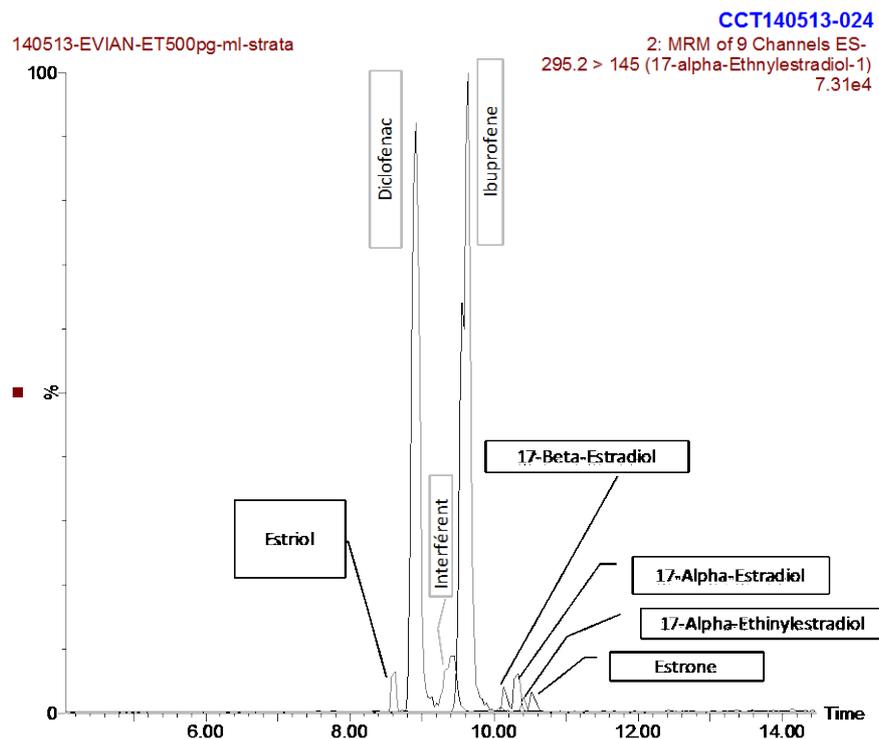


Figure 4: Chromatogramme d'un étalon à 500 ng/L d'eau Evian® en SPE-OL sur Strata™-X (superposition des transitions MRM)

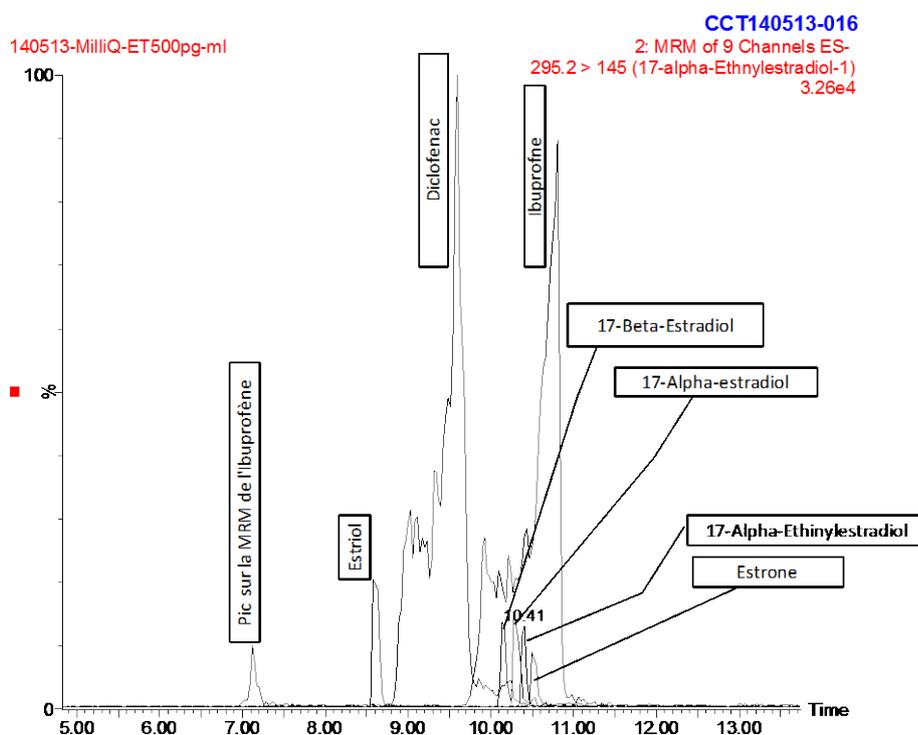


Figure 5: Chromatogramme d'un étalon à 500 ng/L d'eau Milli-Q en SPE-OL sur Strata™-X (superposition des transitions MRM)

4.4 INFLUENCE DU PH DU MILIEU DE TRAVAIL

Dans la partie 4.3, il a été observé des variations notables en fonction du milieu de préparation des échantillons/étalons (Evian® ou eau milli-Q) concernant la qualité de la séparation chromatographique en particulier pour le diclofénac et l'ibuprofène. Cet aspect a été ainsi particulièrement étudié.

Des tests ont ainsi été effectués avec du diclofénac en comparant 3 milieux différents pour la préparation des échantillons/étalons: l'eau d'Evian®, l'eau MilliQ et de l'eau pour HPLC/MS (provenant de Fluka®, ref 39253). Des profils chromatographiques très différents ont été constatés en fonction des eaux testées. Des pics symétriques sont obtenus avec l'eau d'Evian® alors que des pics difformes sont obtenus pour les 2 autres eaux. Les temps de rétention sont plus importants pour ces eaux que pour l'eau d'Evian® (Figure 6).

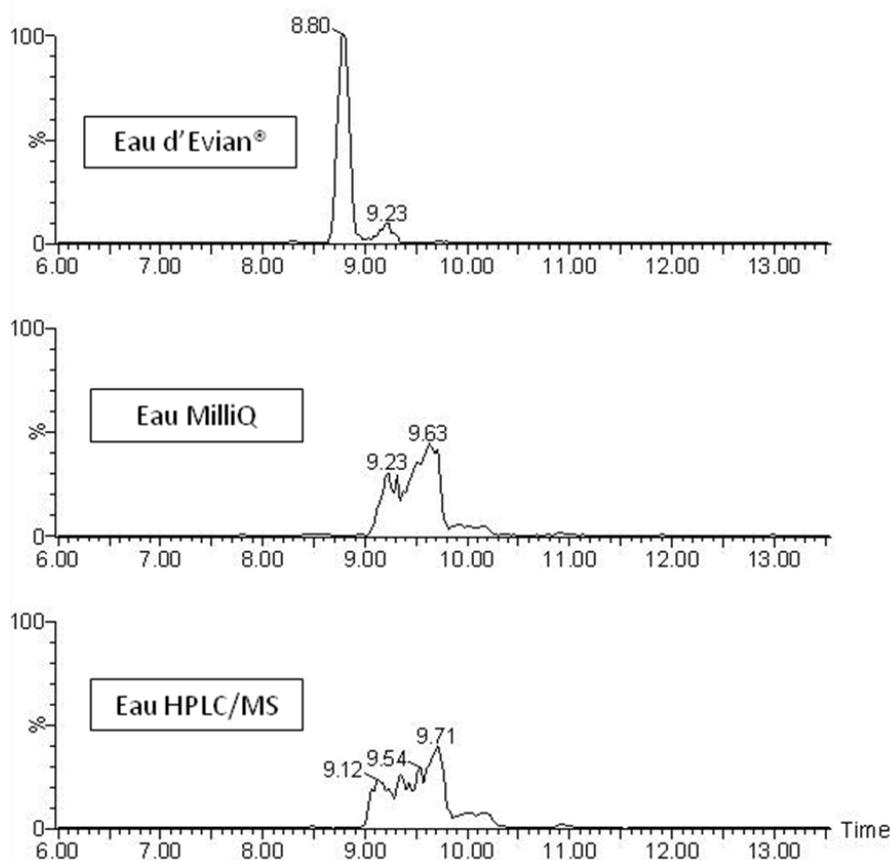


Figure 6 : Profils chromatographiques obtenus pour le diclofénac selon le milieu de travail

Le diclofénac ($pK_a = 4,01$) possède une fonction acide. Ainsi, comme l'illustre la Figure 7, pour les pH acides, jusqu'à $pH=4$, la fonction acide du diclofénac est entièrement sous forme protonée (neutre) ($COOH$). Entre $pH=4$ et $pH=8$, le diclofénac est sous une forme partiellement ionisée (COO^-). La polarité du diclofénac est ainsi plus forte dans cette zone. Ainsi, le pH de l'eau de l'échantillon (ou de préparation des étalons) pourrait avoir une influence sur la forme dans laquelle se trouve le diclofénac et ainsi sur les interactions avec la cartouche SPE-OL et ensuite en partie avec la colonne chromatographique. Au-delà de $pH = 8$, la molécule est sous forme entièrement ionisée.

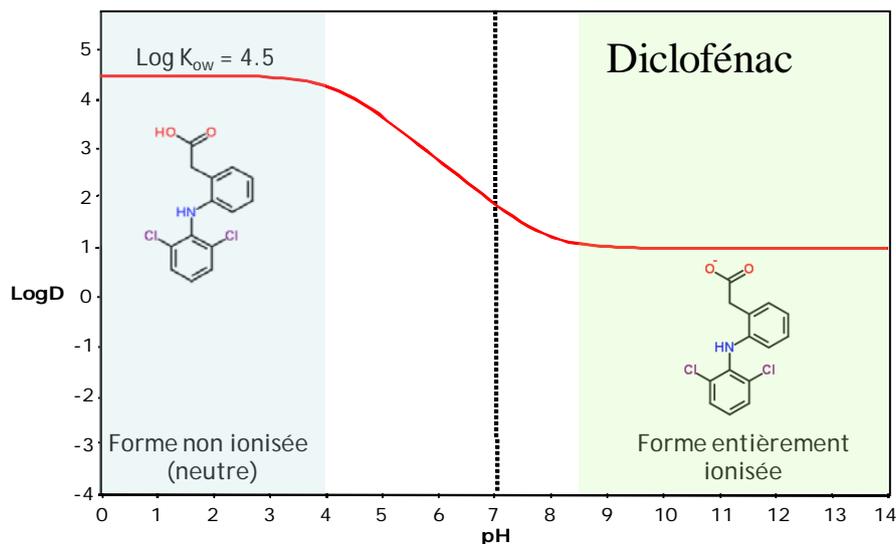


Figure 7: Log D vs pH pour le diclofénac

Les valeurs mesurées pour les pH (mesurées au pH-mètre) des eaux sont les suivantes :

- eau LC/MS : pH = 5,6
- eau milliQ : pH = 5,4 (l'ion milliQ n'est plus censée contenir d'ions en théorie, cependant cette valeur est obtenue sur les résidus ioniques contenues dans cette eau)
- eau d'Evian® : pH = 7,2

Le pH mesuré est en corrélation avec les observations constatées pour l'analyse du diclofénac. A pH~5,5, le diclofénac est selon la Figure 7 à moitié sous forme ionisée alors qu'à pH = 7, il est ionisé à plus de 90 %. Ainsi, à pH = 5,5, il présente plus d'interaction avec la colonne chromatographique ce qui lui confère des temps de rétention plus important. Le fait d'être partiellement ionisé implique aussi des interactions différentes au niveau du piégeage de la cartouche SPE-OL.

Ainsi, à pH = 5,5, il ne va pas être piégé avec homogénéité et sera réparti le long de la cartouche. La forme protonée (COOH) présente plus d'affinité donc elle sera piégée majoritairement en tête de cartouche alors que la forme ionisée (COO⁻) migrera plus à l'intérieur de la cartouche. Ainsi, lors de la désorption et de l'analyse par la colonne chromatographique, des pics larges sont obtenus.

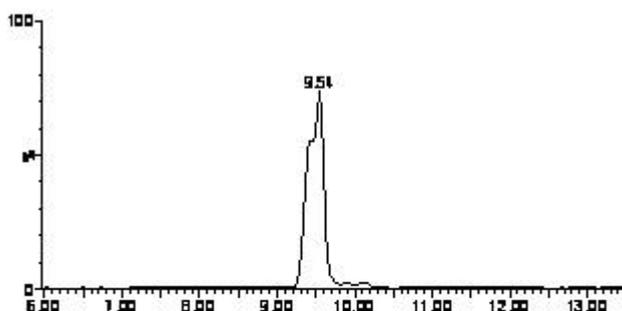
Pour l'analyse de ce composé, il vaut mieux se placer préférentiellement à pH acide (<4) pour favoriser les interactions avec la phase de la cartouche SPE. On peut également se placer à un pH où le composé est totalement ionisé (ou pratiquement totalement ionisé comme constaté avec l'eau d'Evian® à pH = 7,2).

Dans ce cas, les interactions avec le sorbant de la cartouche sont réduites car la fonction acide du diclofénac est sous forme ionisée. Cependant, une large partie de la structure du diclofénac (ou de l'ibuprofène) est hydrophobe. Ces 2 groupements phényles peuvent également engendrer de nombreuses interactions π - π avec le support HLB®.

Ainsi, même à cette gamme de pH (entre 6 et 8), les interactions sont suffisamment fortes pour obtenir une extraction par le support HLB® de ce composé. Ce constat est supporté par le temps de rétention chromatographique important constaté pour l'analyse de la forme ionisée du diclofénac, le pH de la phase mobile lors de l'analyse chromatographique n'étant pas tamponné.

Afin de confirmer que le pH de l'eau était bien responsable de l'élargissement des pics, de l'eau d'Evian® a été ajustée à un pH= 5,5 (par ajout d'acide formique à 98 %).

Diclofénac dans l'Evian®
ajusté à pH = 5,5



Diclofénac dans l'Evian®

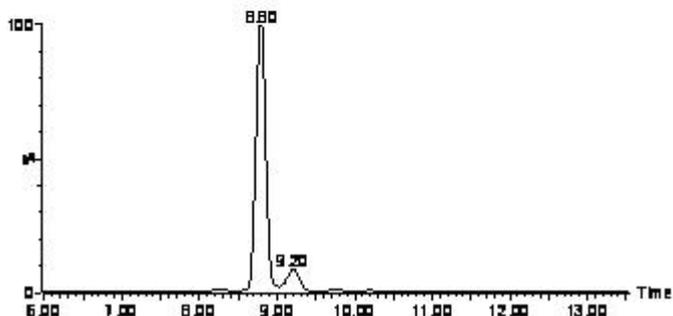


Figure 8 : Comparaison de profils chromatographiques du diclofénac dans l'Evian® et dans l'Evian® à pH=5,5

Des variations du temps de rétention et de la forme de pic comparables à celles observés pour l'eau MilliQ ou eau LC/MS est constatée. Cela démontre l'importance du pH ou de l'ajustement du pH lorsque la SPE-OL est pratiquée sur des composés avec des fonctions ionisables. Les hormones estrogéniques n'ayant pas de fonctions ionisables (hors pH extrême), elles ne sont pas affectées par un changement de pH.

Le même constat peut être établi pour l'ibuprofène ($pK_a = 4,91$) car il présente un profil log D vs pH semblable à celui de l'ibuprofène (annexe 7).

Ainsi, lorsque des études d'optimisation d'extraction sont effectuées sur des molécules présentant des groupements ionisables (acide ou basique), un profil log D vs pH peut être tracé afin de pouvoir visualiser les zones d'ionisation et d'interaction avec le sorbant en fonction du pH (ce type de courbe peut être obtenu en accès libre sur le site [chemicalize.org](http://www.chemicalize.org) de ChemAxon ; <http://www.chemicalize.org/>).

4.5 OPTIMISATION DE LA SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DE LA 17-ALPHA ET 17-BETA ESTRADIOL

En couplant la SPE en ligne avec LC/MS/MS, la séparation chromatographique peut être altérée. En effet, l'extraction par la cartouche s'effectue pendant 2 min. La cartouche étant longue de quelques millimètres, il peut y avoir une migration des composés piégés en début de chargement à travers la cartouche. Cette migration entraîne qu'un même composé est réparti sur la cartouche SPE-OL sur plusieurs millimètres. Lors de l'étape de désorption, la cartouche est balayée par la phase mobile : lorsque les composés piégés vont commencer à être désorbés de la cartouche, ce léger décalage va perdurer le long de l'analyse. Il peut se produire une légère refocalisation au niveau de la colonne chromatographique mais les pics sont donc généralement un peu plus larges avec une configuration SPE-OL-LC/MS/MS qu'en mode par injection liquide.

Ce point est particulièrement critique dans cette étude pour l'analyse de la 17-alpha et 17-bêta-estradiol qui doivent absolument être séparés chromatographiquement.

Lors des tests effectués avec le même gradient que celui utilisé pour l'injection liquide, la résolution obtenue pour les 2 isomères de l'estradiol est effectivement plus basse et le retour à la ligne de base n'est plus obtenue (Figure 9). Les deux isomères coéluent.

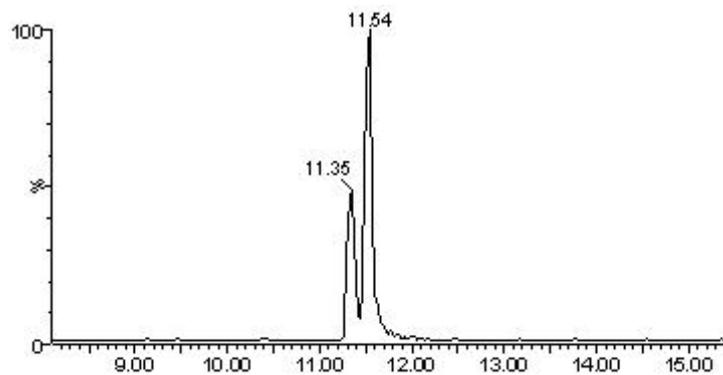


Figure 9. Chromatogramme de la 17- α et 17- β estradiol après analyse par SPE-OL-LC/MS/MS

Afin d'optimiser la séparation chromatographique, 2 paramètres ont été étudiés :

- la température de four de la colonne.
- la proportion maximale d'acétonitrile dans la phase mobile à la fin de l'étape d'éluion

1) Influence de la température du four

Ces essais ont été réalisés avec une fin de gradient d'élution à 80 % d'ACN.

La température du four a été testée de 30 à 50 °C.

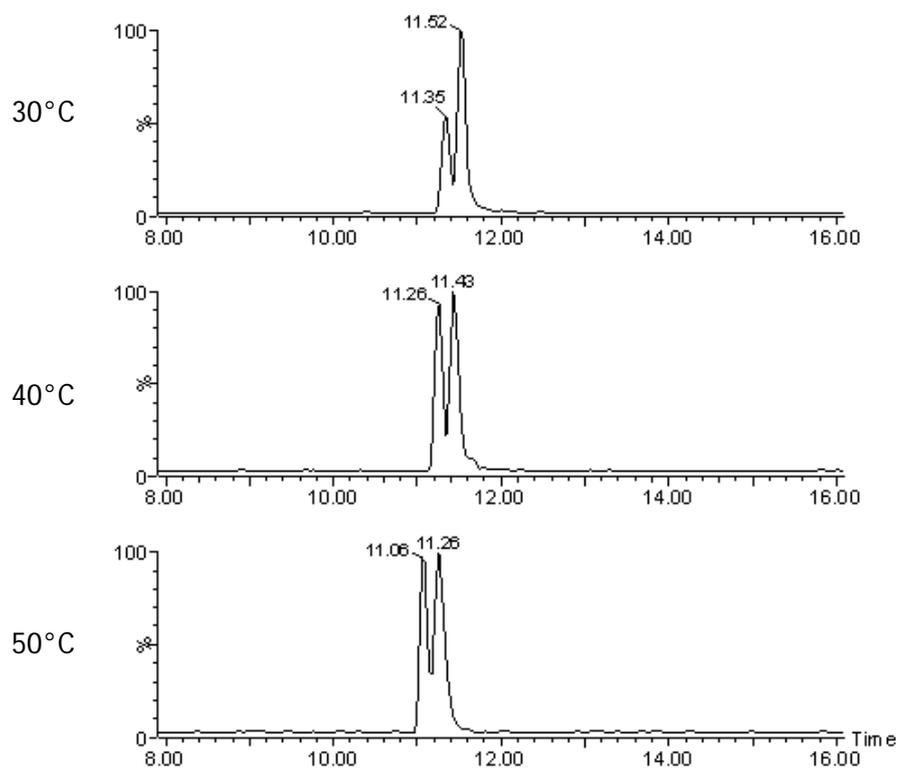


Figure 10. Influence de la température de la colonne sur la résolution chromatographique de la 17-alpha et 17-bêta estradiol

L'augmentation de la température de la colonne ne permet pas d'augmenter la résolution chromatographique des 2 isomères.

Le seul effet observé concerne le temps de rétention qui diminue en fonction de l'augmentation de la température du four de la colonne.

2) Influence du pourcentage d'acétonitrile en fin de rampe de gradient d'élution

Le début de programme d'élution n'a pas été modifié et démarre à 40 % d'acétonitrile car les 2 isoformes sont plutôt bien retenues sur la colonne, le début de gradient a peu d'influence sur leur migration à travers la colonne.

Ainsi, dans les conditions habituelles d'analyse par injection liquide, le pourcentage d'acétonitrile en fin de rampe de gradient d'élution est de 80 %.

3 autres pourcentages d'acétonitrile en fin de gradient ont été ainsi évalués: 60 %, 70 % et 90 %. Le fait de terminer en un % d'acétonitrile plus bas permet de retenir les composés plus longtemps dans la colonne ce qui peut contribuer à une meilleure séparation.

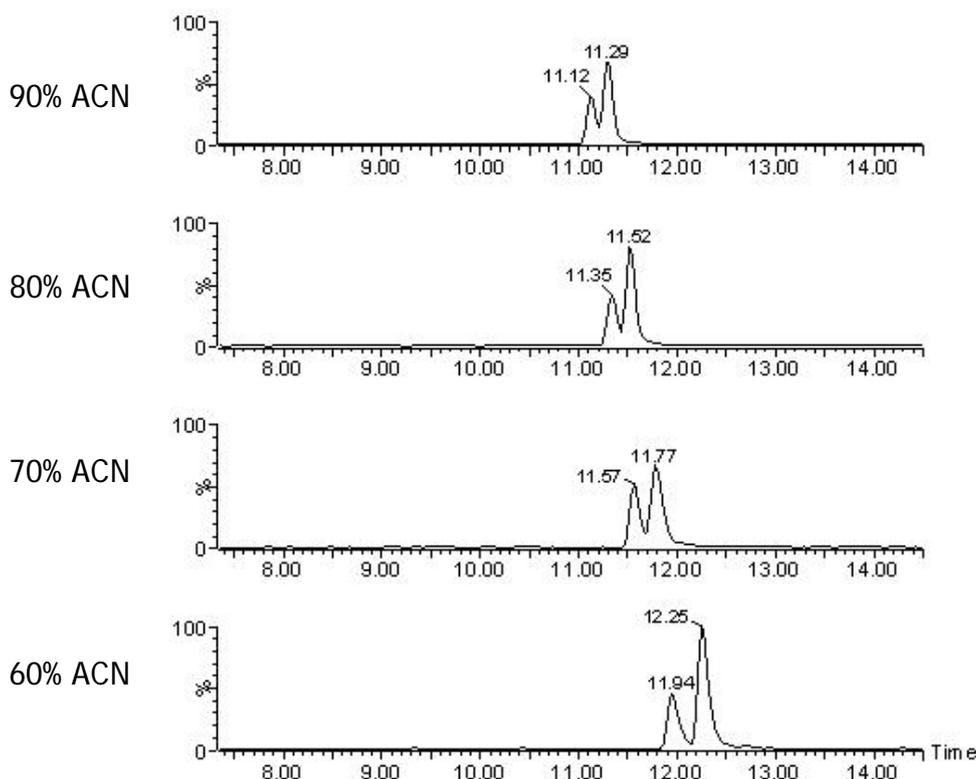


Figure 11. Influence du pourcentage d'acétonitrile sur la résolution chromatographique de la 17-alpha et bêta-estradiol

Les conditions de gradient d'élution où la fin de rampe est à 60 % d'ACN permettent d'obtenir la séparation la plus satisfaisante par rapport aux autres pourcentages utilisés.

Ce gradient a donc été utilisé pour les analyses par SPE-OL et est détaillé en annexe 3b.

4.6 ÉVALUATION DES PERFORMANCES DES CARTOUCHES TESTÉES

Afin de comparer les différentes cartouches, des solutions de différentes concentrations allant de 5 à 550 ng/L ont été préparées dans l'eau MilliQ et l'eau d'Evian® et injectées.

Des résultats probants n'ont pas pu être obtenus pour la cartouche Synergi™ - Fusion – RP car de nombreux problèmes d'interférences et de fonctionnement (cette cartouche générait plus de pression) rendent son utilisation problématique.

CAPACITÉ D'EXTRACTION DES CARTOUCHES

En mode SPE-OL, les rendements d'extraction ne sont généralement pas calculés. En effet, l'étalonnage et les analyses des échantillons s'effectuant selon le même procédé, la technique s'apparente à un étalonnage en matrice.

Ainsi, les aires obtenues pour les différentes concentrations testées ont été normalisées par rapport aux aires obtenues avec la cartouche HLB® (phase considérée comme référence car utilisée pour la MA-12). Une moyenne a ensuite été calculée pour les valeurs obtenues pour les différentes concentrations testées (de 5 à 550 ng/L) par cartouche.

Tests effectués en eau MilliQ

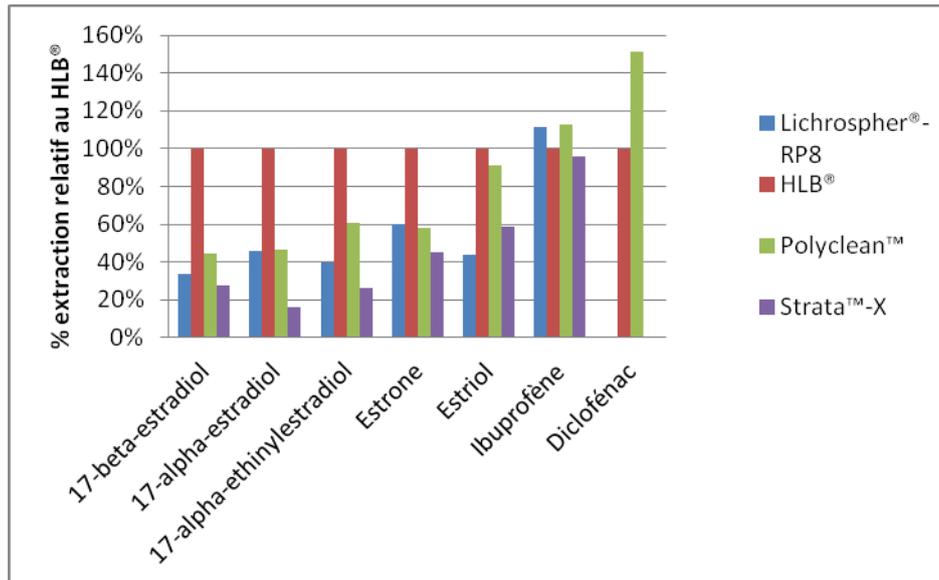


Figure 12 : Pourcentage d'extraction relatif vs. HLB®

Pour l'extraction des hormones estrogéniques, de meilleures extractions sont obtenues avec la cartouche HLB® par rapport aux autres cartouches. Étonnamment, des résultats largement inférieurs (entre 16 et 59 %) sont obtenus avec la cartouche Strata™-X alors que la nature de l'adsorbant et les dimensions de la cartouche sont proches de la HLB®.

Pour l'ibuprofène, des résultats similaires sont retrouvés pour toutes les cartouches. Le diclofénac n'a pas pu être mesuré pour les cartouches Lichrospher®-RP₈ et Strata™-X à cause de l'obtention de pics particulièrement difformes.

Tests effectués en eau d'Evian®

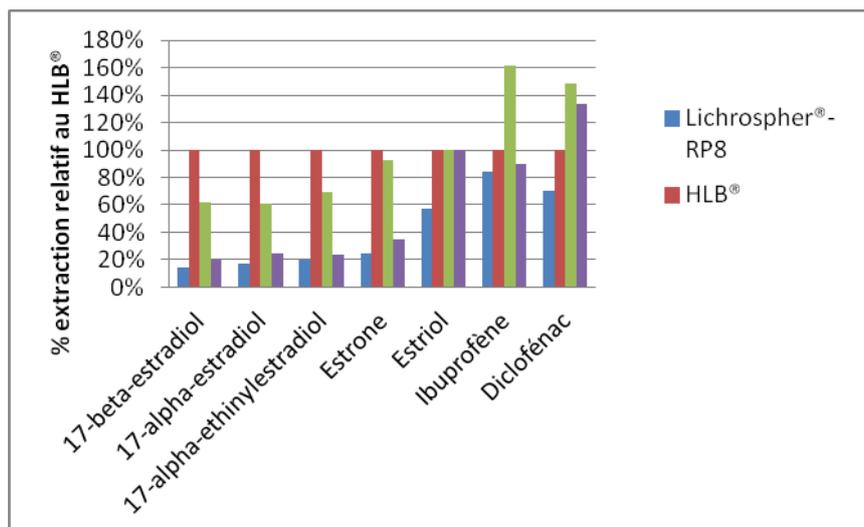


Figure 13: Eau d'Evian® - Pourcentage d'extraction vs. cartouche HLB®

Pour les hormones estrogéniques, des résultats identiques à ceux observés avec l'eau MilliQ sont obtenus à l'exception de l'estriol qui est autant extrait avec les colonnes Polyclean™302H et Strata™-X. Pour les AINS, de meilleures extractions sont obtenues avec la cartouche Polyclean™302H.

4.6.1 LIMITES DE QUANTIFICATION ET GAMME DE CONCENTRATION

Les limites de quantification ont été estimées, pour chaque milieu testé, par rapport aux différentes concentrations injectées pour chaque cartouche ainsi que par rapport à un signal sur bruit (S/N=10).

Tableau 7: Tableau de synthèse des limites de quantification (en ng/L) estimées en fonction de la cartouche SPE et du milieu de travail

Cartouche SPE :	Lichrospher®-RP ₈		HLB®		Polyclean™302H		Strata™-X	
	Evian®	Milli-Q	Evian®	Milli-Q	Evian®	Milli-Q	Evian®	Milli-Q
Diclofénac	5	/	5	10	5	10	5	/
Ibuprofène	20	15	15	15	10	30	15	25
Estriol	200	150	50	50	50	50	50	50
Estrone	300	200	50	50	50	50	100	100
17-bêta-estradiol	200	200	10	50	25	50	100	100
17-alpha-estradiol	100	100	5	50	20	20	50	50
17-Alpha-éthynylestradiol	400	400	50	100	50	100	150	200

Globalement, de meilleures limites de quantification sont obtenues avec de l'eau d'Evian® et la cartouche HLB®.

GAMME DE TRAVAIL

Tous les résultats obtenus avec les différentes cartouches ont présenté une linéarité s'établissant de la limite de quantification ou du point supérieur testé au dessus de la limite de quantification jusqu'à point haut testé (550 ng/L).

A titre d'exemple sont présentées les gammes obtenues pour le 17-alpha-estradiol et l'ibuprofène avec la cartouche HLB®.

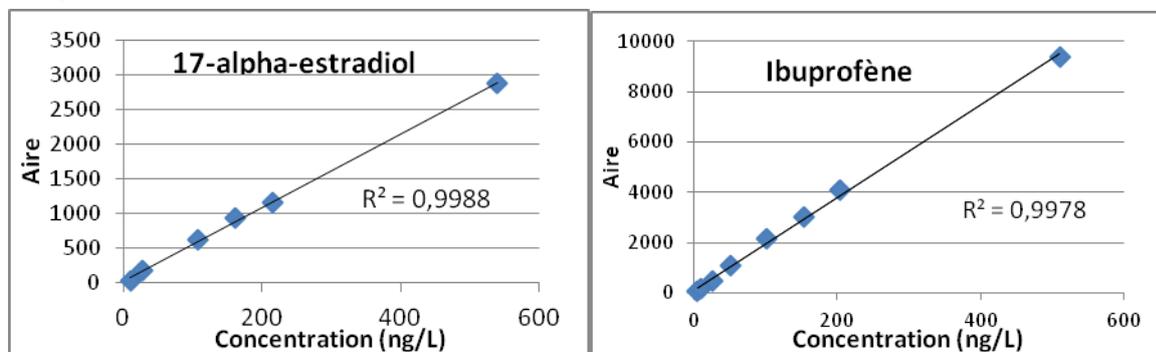


Figure 14 : Gamme de linéarité pour le 17-alpha-estradiol et l'ibuprofène par étalonnage SPE-OL avec cartouche HLB® dans l'eau d'Evian®

La cartouche HLB® a été retenue pour la suite des expériences car globalement, de meilleures performances ont été obtenues avec cette cartouche.

4.7 INFLUENCE DU POURCENTAGE DE SOLVANT DANS L'EVIAN® ET DU VOLUME DE CHARGEMENT SUR LA CARTOUCHE SPE-OL

Ce test a été effectué pour évaluer la capacité de rétention des cartouches notamment en vue d'une double préconcentration avec extraction par SPE puis une reprise des échantillons dans un certain volume de solvant. Il fallait donc déterminer quel volume/pourcentage de solvant pouvait être utilisé avant que la saturation de la cartouche par les composés n'intervienne.

Le gradient chromatographique est un premier indicateur pour connaître le degré d'interaction d'un composé avec un support majoritairement hydrophobe. Ainsi, pour ces composés, le gradient chromatographique démarre à 40 % de solvant et les composés d'intérêt commencent à être élués de la colonne avec des pourcentages compris entre 50 et 80 %. L'utilisation d'un faible pourcentage d'acétonitrile dans les échantillons ne devrait pas perturber l'extraction de ces composés.

Ainsi, les capacités de rétention et volume de fuite de la cartouche HLB® ont été évalués. Des solutions à 200 ng/L par composé ont été préparées dans des solutions contenant de l'eau d'Evian® et différents pourcentages d'acétonitrile (de 0 à 40 %).

Différents volumes d'échantillon, de 300 à 1500 µL par simple chargement, puis de 1800 µL à 3000 µL (par double chargement) ont été testés.

L'évolution des aires des pics a été suivie en fonction de ces différents tests et est présentée dans les figures ci-après.

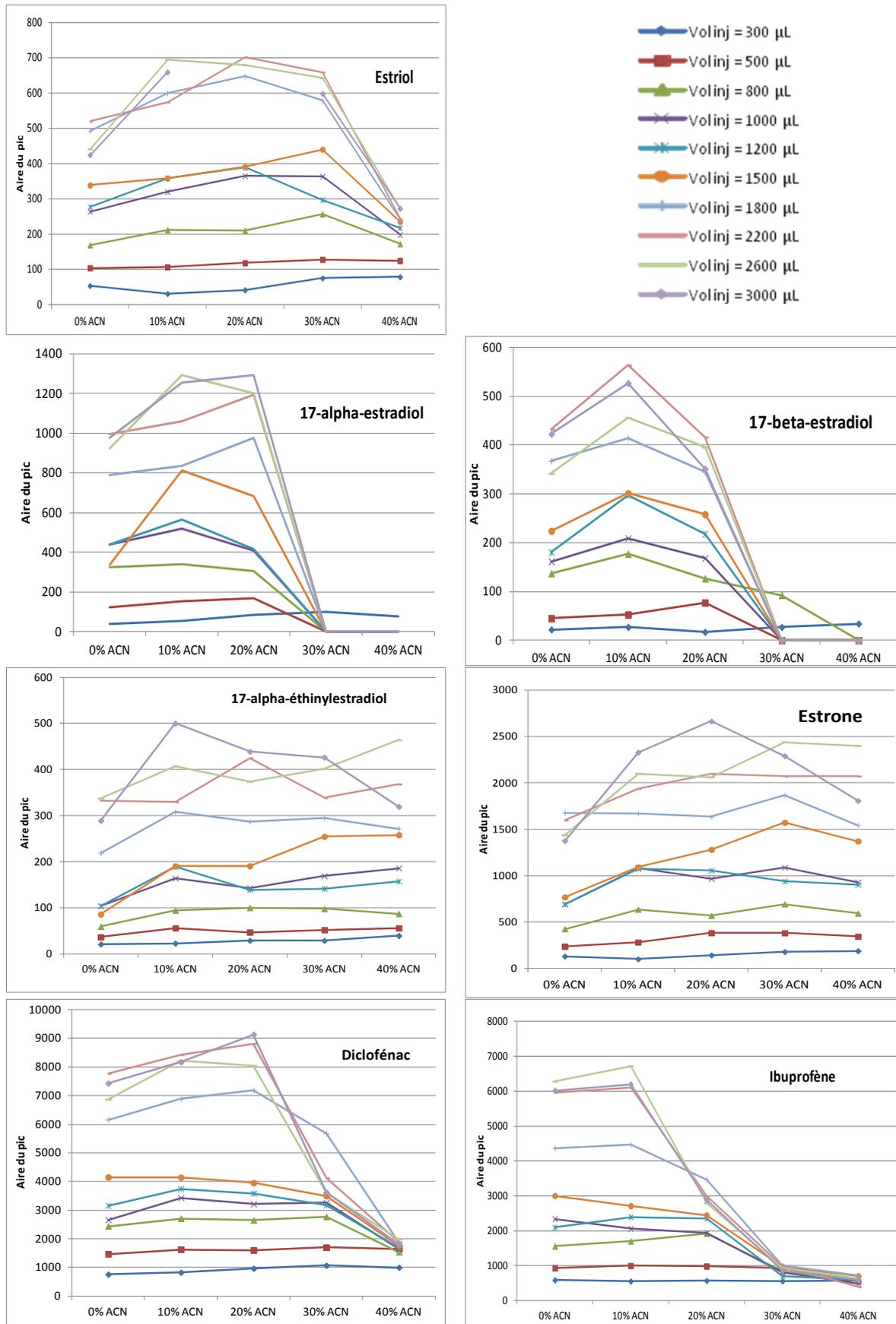


Figure 15 : Influence du pourcentage d'acétonitrile (ACN) dans l'eau d'Evian® et du volume de chargement sur la cartouche

Pour l'estriol, le composé le moins retenu chromatographiquement, le changement du volume d'échantillon ou du pourcentage de l'acétonitrile produit peu de différences. Ainsi, il semble que l'extraction de ce composé est seulement réduite à partir de 40 % d'acétonitrile pour des chargements d'au moins 800 µL.

Pour le 17-alpha et 17-bêta estradiol, une tendance similaire est observée avec une perte très importante de signal à partir de pourcentage d'acétonitrile d'au moins 30 % et ce pour n'importe quel volume de chargement à l'exception de 300 µL.

Les réponses obtenues pour le 17-alpha-éthynylestradiol et l'estrone sont relativement stables quelque soit le volume de chargement et le pourcentage d'acétonitrile testés. Ces 2 composés sont les plus retenus sur la colonne chromatographique parmi les hormones estrogéniques étudiées. Bien que la phase extractante de la cartouche HLB® ne soit pas similaire à la phase C₁₈ de la colonne Kinetex®C₁₈, certains parallèles peuvent être établis entre la rétention des composés notamment vis-à-vis de l'augmentation de la force éluante en acétonitrile.

Pour le diclofénac, les aires chutent quand le taux d'acétonitrile atteint ou dépasse 30 %. Le seuil critique est constaté pour l'ibuprofène à partir de 20 %. Pour ces 2 molécules, ces effets sont particulièrement marqués pour les taux de chargement à partir de 1800 µL. A noter que ces essais ont été effectués avec de l'eau d'Evian® non tamponnée. Pour ces 2 molécules, d'après leur profil de log D, l'utilisation d'un pH acide (inférieur à pH = 4) serait probablement optimum pour favoriser les interactions entre une forme protonée et le support adsorbant.

Pour la plupart des composés, le chargement de 3000 µL semble ne plus apporter de gain par rapport à des chargements 2200 ou 2600 µL. Le temps de chargement pour de tels volumes renforce peut être le phénomène de fuite des composés à travers la cartouche.

En conclusion, pour cette partie, il a été défini les zones de robustesse du protocole pour les paramètres d'extraction des composés en fonction du volume de chargement et du pourcentage d'acétonitrile. Ainsi, une réponse stable est observé pour tous les composés pour un simple chargement jusqu'à un volume de 1500 µL et des pourcentages d'acétonitrile de 20 %.

Il doit être souligné que toutes ces expériences ont été effectuées avec de l'eau d'Evian®.

Ces conclusions pourraient être différentes en présence d'une matrice beaucoup plus complexe car des problèmes d'interférences ou des compétitions d'adsorption avec les analytes pourraient alors survenir.

Ainsi, pour rester dans une certaine zone de robustesse et tenir compte de ces possibles phénomènes, les composés ont été préparés et injectés avec des pourcentages d'acétonitrile de 10 % dans l'étude de double préconcentration par SPE.

5. EXTRACTION PAR SPE (HORS LIGNE)

L'extraction sur phase solide (SPE) a été effectuée sur un litre d'eau avec une cartouche HLB®. Les taux de récupération ont ainsi été calculés par comparaison des aires obtenues avec l'injection liquide en LC/MS/MS avec les mêmes solutions ayant servi pour le dopage des échantillons.

Le type de cartouche choisie pour l'extraction SPE est la cartouche HLB® 6cc-200mg (WAT106202), identique à celle utilisée pour la fiche méthode Aquaref MA-12.

Deux milieux ont été testés : l'eau d'Evian® et l'eau de l'Oise filtrée (sur filtre de verre (PALL-Life science Type A/E-Glass 142 mm)).

Les extractions ont été effectuées à l'aide d'un automate SPE Gilson GX-274 ASPEC™.

Les analyses suivantes ont été effectuées pour chaque milieu :

- 4 échantillons d'eau
- 4 échantillons d'eau enrichie à 50 ng/L
- 4 échantillons d'eau enrichie à 150 ng/L

Afin de favoriser l'extraction du diclofénac et de l'ibuprofène, les échantillons ont été traités par ajout d'acide chlorhydrique à 37 % pour obtenir un pH = 2. La méthode d'extraction par SPE est effectuée selon la méthode décrite en annexe 8. Pour ces expériences, l'extrait méthanol (issu des 3 éluions, chacune de 2 mL) est concentré à quasi siccité avant d'être repris par 1 mL d'un mélange Acétonitrile/Eau 40 :60.

Ces essais sont réalisés sans ajout d'étalons marqués.

5.1 BRUIT DE FOND ENGÉNDRÉ PAR L'ANALYSE D'EAU D'EVIAN® AVEC UNE CARTOUCHE HLB®

Le bruit de fond a été mesuré afin de déterminer l'influence de l'injection d'un extrait issu par une analyse hors ligne sur l'analyse en ligne dans les conditions testées. Ainsi, un extrait obtenu sur une cartouche HLB® à partir d'eau d'Evian®, est présenté ci-dessous. Il est comparé à celui d'une injection de solvant (Acétonitrile/Eau ; 40 / 60) et présenté en fonction des transitions MS/MS :

Tableau 8 : Bruit de fond (exprimé sous la forme d'une amplitude en hauteur avec unité arbitraire) enregistré sur chaque transition de composé d'intérêt (analyse d'eau d'Evian®) entre une injection solvant et après l'extraction d'une cartouche HLB®

Composé	17-Alpha- et 17-Bêta- estradiol	Estriol	Estrone	17-alpha- Ethinylestradi ol	Diclofénac	Ibuprofène
Transition suivie	271,2 > 145,0	287,2 > 171,0	269,1 > 143	295,2 > 145	295,2 >145,0	205,1 > 161,1
HLB®	1550	2700	780	2000	2200	1700
Solvant	270	170	170	170	210	330

Le bruit de fond est 5 à 20 fois plus important sur les extraits obtenus à partir de l'analyse de l'eau d'Evian® avec la cartouche HLB® sur les transitions suivies. Ce bruit de fond supplémentaire pourrait provenir soit directement de la cartouche, soit de l'eau d'Evian®, soit de la re-concentration du méthanol (et donc des éventuelles impuretés contenues dedans).

5.2 TAUX DE RÉCUPÉRATION DES MÉDICAMENTS PAR EXTRACTION SPE HLB®

Les résultats des extractions de l'eau en phase dissoute sur SPE-HLB® sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 9 : Taux de récupération des composés cibles extraits sur SPE - HLB® (n=4)

	Valeur de dopage (ng/L)	EVIAN®		OISE	
		Taux de récupération (%)			
		Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
17-bêta-estradiol	Blanc	< LQ	/	< LQ	/
	50	89	10	57	3
	150	91	9	49	4
17-alpha-estradiol	Blanc	<LQ	/	<LQ	/
	50	94	23	52	9
	150	91	10	51	1
17-alpha-éthinyloestradiol	Blanc	< LQ	/	<LQ	/
	50	81	5	35	13
	150	83	12	25	3
Estrone	Blanc	< LQ	/	< LQ	/
	50	77	5	19	3
	150	71	3	16	1
Estriol	Blanc	Non quantifiable ⁽¹⁾	/	Non quantifiable ⁽¹⁾	/
	50	Non quantifiable ⁽¹⁾	/	Non quantifiable ⁽¹⁾	/
	150	Non quantifiable ⁽¹⁾	/	Non quantifiable ⁽¹⁾	/
Ibuprofène	Blanc	< LQ	/	< LQ	/
	50	68	19	9	1
	150	66	18	8	1
Diclofénac	Blanc	< LQ	/	< LQ	/
	50	92	7	19	4
	150	81	9	19	0

⁽¹⁾ : L'estriol n'a pas pu être quantifié car le bruit de fond observé sur la cartouche HLB® ne permettait pas d'identifier le signal du composé.

Aucun composé cible n'est observé dans les eaux non dopées.

Les taux de récupération des extractions sur l'eau d'Evian® s'étendent de 66 % à 94 % alors que ceux obtenus sur l'eau de l'Oise s'étendent de 8 % à 57 %. En revanche, des taux de récupération identiques à ± 10 % sont obtenus entre les 2 concentrations testées.

Les analyses sur l'eau d'Evian® ont démontré que la cartouche est adaptée pour l'extraction des estrogènes visées, comme cela avait été obtenu pour la fiche MA-12.

Cependant, les faibles taux de récupération obtenus avec l'eau de l'Oise peuvent donc être attribués à des effets de matrice. Ces effets matrice ont notamment pu intervenir lors de la détection provoquant des baisses d'ionisation de signal et ainsi une contribution à ces taux relativement faibles.

La saturation de la colonne en composés, ou fuite, a pu également se produire pendant le passage d'1 L d'échantillon.

6. DOUBLE EXTRACTION : SPE (HORS LIGNE) SUIVIE DE SPE-OL

Le couplage d'une double préconcentration peut permettre, en théorie, d'atteindre des niveaux de sensibilité hors de portée d'une utilisation d'une seule de ces 2 techniques individuellement. La SPE en ligne est considérée comme une technique qui vise à simplifier le processus analytique. Dans le cadre de cette étude, la SPE en ligne est utilisée comme un mode d'injection, au même titre que l'injection liquide, mais qui offre en plus l'avantage de pouvoir injecter la totalité de l'échantillon et ainsi d'abaisser, en théorie, les limites de quantification.

Pour ces expériences, l'extraction d'1 L d'eau est réalisée par SPE sur cartouche HLB® 6cc-200 mg (annexe 8), l'extrait méthanol est concentré à quasi-siccité et repris par 1,5 mL d'un mélange acétonitrile/eau (10 / 90).

Les conditions de préparation d'échantillon (eau avec 10 % d'acétonitrile) ont été choisies pour être compatibles avec l'analyse par SPE-OL (voir paragraphe 4.8). Ainsi, la totalité des 1,5 mL est percolée sur la cartouche de SPE-OL puis les composés piégés sont ensuite élués et analysés par LC/MS² (selon la méthode décrite en annexe 3-b).

En théorie, en considérant les taux de récupération moyens obtenus sur l'eau d'Evian® pour la SPE et en se basant sur les sensibilités obtenues en SPE-OL (eau d'Evian®), les LQ suivantes pourraient être atteintes.

Tableau 10 : Limites de quantification estimées pour l'analyse par double pré-concentration SPE (1L extrait) + SPE-OL avec l'eau d'Evian®

	Taux de récupération (%)	LQ estimée en SPE-OL (ng/L)	LQ estimée SPE + SPE-OL (pg/L)
17-bêta-estradiol	90	10	11
17-alpha-estradiol	93	5	6
17-alpha-éthynylestradiol	82	50	61
Estrone	74	50	67
Estriol	80*	50	62
Ibuprofène	67	15	22
Diclofénac	86	5	6

* : estimé d'après les valeurs obtenues pour les autres hormones

Ces LQ sont estimées pour l'appareil analytique et en particulier le détecteur que nous avons utilisé (Waters® Acquity TQD). D'autres types de détecteur ou de génération plus récente devraient permettre d'atteindre des niveaux plus bas.

Deux milieux ont été testés : l'eau d'Evian® et l'eau de l'Oise filtrée.

Pour chaque milieu, il a été analysé :

- 4 échantillons d'eau
- 4 échantillons d'eau enrichie à 8 pg/L (point bas de la gamme de travail, proche de la LQ estimée pour certains composés)
- 4 échantillons d'eau enrichie à 16 pg/L
- 4 échantillons d'eau enrichie à 82 pg/L
- 4 échantillons d'eau enrichie à 245 pg/L (point de haut de gamme de travail)

Les étalons internes comme décrits en 1.1 ont été ajoutés individuellement à une concentration de 180 pg/L.

6.1 RENDEMENTS D'EXTRACTION PAR DOUBLE PRÉ-CONCENTRATION

ANALYSES SUR EAU D'EVIAN®

Les résultats des essais sont présentés en rendement, par correction des étalons internes, dans les paragraphes suivants. En effet, comme indiqué précédemment, sachant que l'étalonnage par SPE-OL est effectué en matrice (eau d'Evian®), le calcul des taux de récupération n'est pas pertinent.

Analyse des hormones estrogéniques

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 11: Rendements d'extraction par double concentration des hormones estrogéniques dans l'eau d'Evian® (n=4)

Valeur de dopage pour chaque composé	17-bêta estradiol	17-alpha estradiol	Estrone	17-alpha-éthynylestradiol	Estriol
8 pg/L	445% ± 56%	231% ± 22%	Pollution	s.o.	Massif interférent
16 pg/L	307% ± 29%	258% *	Pollution	s.o.	Massif interférent
82 pg/L	88% ± 39%	88% ± 15%	Pollution ; 122% ± 14% ' ,	111%*	Massif interférent
245 pg/L	79% ± 25%	77% ± 47%	Pollution	60% ± 36%	Massif interférent

* Calculé sur une valeur, 'obtenu sur un deuxième essai

Pour le 17-alpha et 17-bêta-estradiol, les essais à 8 et 16 pg/L présentent des résultats faussés par un bruit de fond trop important. Les effets de matrice notamment le bruit apporté par le processus impliquant la cartouche SPE rendent la détection impossible à ces niveaux de concentration.

Les rendements obtenus à 82 pg/L et à 245 pg/L sont acceptables (> 70 %) mais les écarts types sont élevés (entre 15 et 47 %). L'utilisation de composés isotopiquement marqués apparait cependant indispensable pour la mesure à ces concentrations.

Pour l'estrone, lors d'une première série d'essai, une pollution évaluée à hauteur de 400 pg/L n'a pas permis de calculer les rendements. L'origine de cette pollution est supposée provenir du système automatisé SPE. Malgré 2 séries de lavages, ce système a peut être relargué des traces d'estrone restées dans le circuit de pompage de l'automate après des essais à 100 ng/L. L'hypothèse d'une teneur résultante de la dégradation de l'estradiol en estrone est écartée, les teneurs d'estrone mesurées sont bien trop importantes comparées aux teneurs de dopage en estradiol.

Un deuxième test effectué sur des blancs a démontré que la pollution avait disparu. Ainsi, un essai effectué à 80 pg/L a permis d'obtenir des rendements calculés à 122 %.

Concernant le 17-alpha-éthynylestradiol, comme prévu pour les estimations de la LOQ, les essais à 8 et 16 pg/L ne produisent pas suffisamment de réponse pour être détectés. Pour une teneur à 80 pg/L, le 17-alpha-éthynylestradiol a été mesuré 4 fois mais son étalon marqué en ^{13}C (dopé à 180 pg/L) n'a été récupéré qu'une fois. Dans ce cas, un rendement de 111 % a été obtenu. Pour une concentration de 245 pg/L, un rendement de 60 % est obtenu mais avec un coefficient de variation de 36 %.

La mesure de l'estriol est perturbée par la présence d'un massif lors de l'analyse par LC/MS/MS (voir Figure 16).

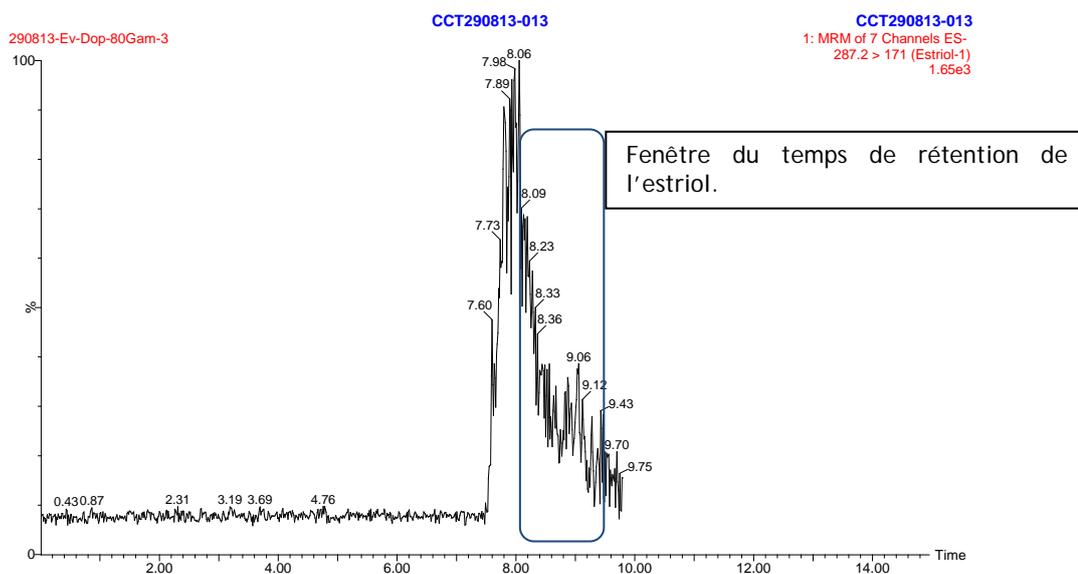


Figure 16 : Chromatogramme (MRM de l'estriol) d'une eau d'Evian® dopée à 82 pg/L d'estriol analysée par double pré-concentration

Analyse du diclofénac et de l'ibuprofène

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 12 Rendements d'extraction par double concentration des AINS dans l'eau d'Evian® (n=4)

Valeur de dopage pour chaque composé	Ibuprofène	Diclofénac
8 pg/L	/	/
16 pg/L	246% ± 13%	214 ± 31%
82 pg/L	121% ± 37%	93% ± 32%
245 pg/L	73% ± 17%	87% ± 13%

Au même titre que pour les résultats obtenus sur les hormones estrogéniques, les résultats de rendement de l'ibuprofène aux teneurs basses de 8 et 16 pg/L sont faussés par un bruit de fond important.

Aux teneurs plus élevées de 82 et 245 pg/L, les rendements calculés sont acceptables (> 70 %) avec des coefficients de variation de 37 à 17 %.

Le diclofénac présente lui aussi des résultats aberrants sur les teneurs à 8 et 16 pg/L avec une séparation chromatographique perturbée par un massif interférent présenté sur le chromatogramme ci-dessous :

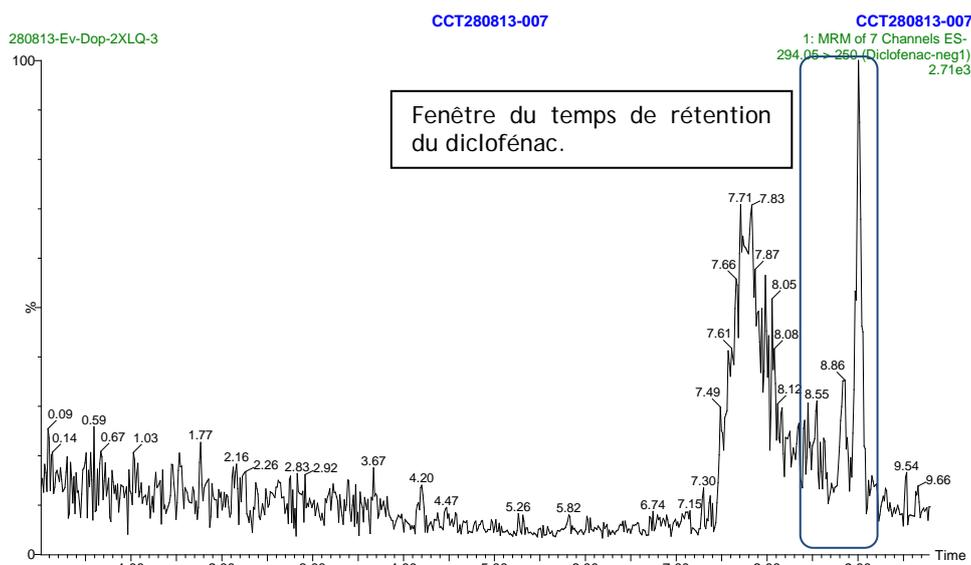


Figure 17 : Chromatogramme (MRM du diclofénac) d'une eau d'Evian® dopée à 82 pg/L de diclofénac analysée par double pré-concentration

Pour les points à 82 et 245 pg/L, les rendements calculés sont satisfaisants (> 87 %) avec des coefficients de variation de 32 à 13%.

ANALYSES SUR L'EAU DE L'OISE

Les analyses sur de l'eau de l'Oise n'ont pas permis d'obtenir un signal quelle que soit la concentration testée. La figure 18 montre la comparaison avec le signal obtenu pour de l'eau d'Evian® à concentration identique.

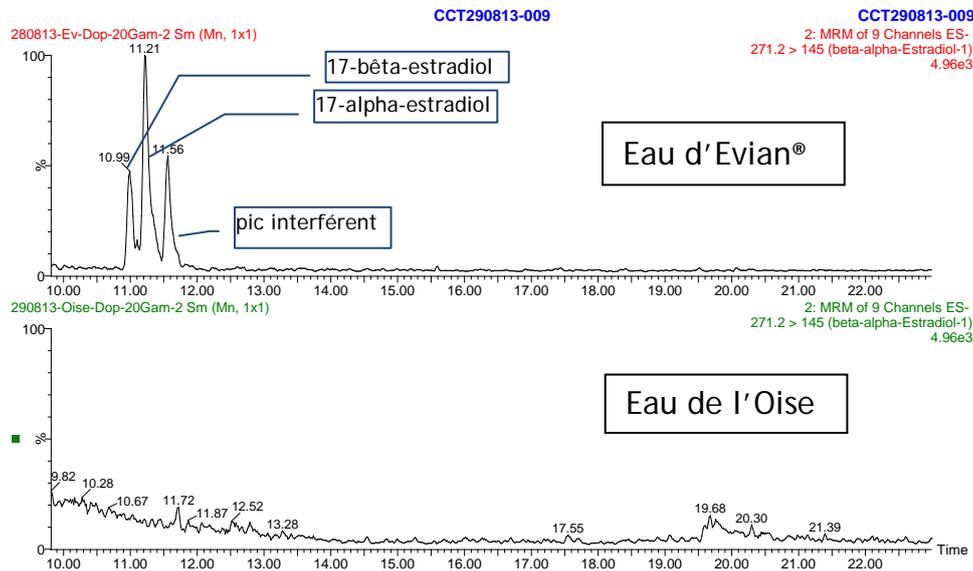


Figure 18 Chromatogrammes d'eaux dopées à 82 pg/L et extrait par SPE + SPE-OL

Avec en particulier, pour le 17-alpha-éthynylestradiol la présence d'un massif interférent (Figure 19).

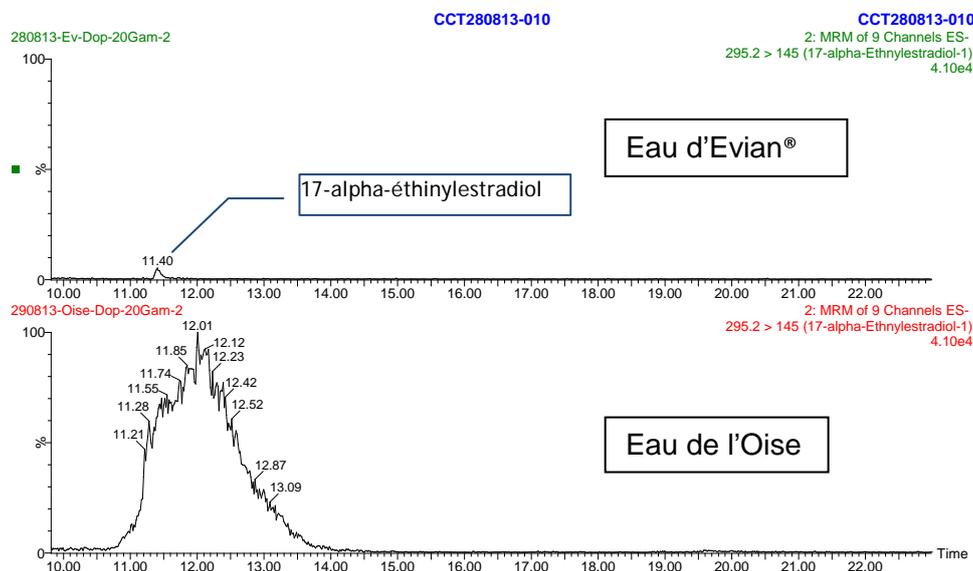


Figure 19 Chromatogrammes d'eaux dopées à 82 pg/L et extrait par SPE + SPE-OL

Des résultats décevants ont été obtenus avec les tests effectués sur une matrice réelle représentative des eaux de surface (de l'eau de l'Oise). En effet, les taux de récupération en SPE (« hors ligne ») ont été relativement bas. Cela peut être attribué soit à un passage d'échantillon trop important (1 L alors que la méthode MA12 est basée sur 250 mL), soit à des interférences (une purification par SPE pourrait être effectuée en plus).

Le problème des interférences se répercute d'autant plus avec une analyse ultérieure par SPE-OL. En effet, la totalité de ce qui est piégé par la cartouche est injecté en SPE-OL. Comme des phases de piégeage identiques ont été utilisées pour le SPE et la SPE-OL, la matrice qui a été piégée en SPE est également extraite en SPE-OL.

Ainsi, une grande partie de la matrice aboutit dans le détecteur et provoque des interférences spectrométriques. Afin de contourner ce problème, soit une diminution du volume de l'échantillon, soit une étape de purification après l'étape SPE pourraient être mises en œuvre afin d'éviter des effets prononcés de matrice.

Une autre option serait de pouvoir disposer d'une orthogonalité d'extraction dans le piégeage des composés cibles et des interférents. Pour ce faire, 2 adsorbants de nature différente devraient être utilisés. Ces 2 adsorbants devraient capter les composés cibles mais ils auraient des propriétés suffisamment différentes pour que chacun puisse réduire en complémentarité l'influence de la matrice.

Après avoir constaté les résultats obtenus sur l'eau de l'Oise, il a été ainsi envisagé de se concentrer spécifiquement sur la mesure des estrogènes. En effet, les problèmes de sensibilité analytiques concernent exclusivement les estrogènes. Ainsi, une méthode multirésidus ne semble pas envisageable et il apparaissait préférable de se réorienter vers l'étude seule de ces molécules.

Ainsi, l'une des options envisagée consiste à effectuer des essais de SPE (ou SPE-OL) avec des polymères à empreintes moléculaires (MIP). Ces adsorbants sont développés de façon à épouser l'empreinte d'une molécule cible ou d'un fragment de molécules caractéristiques d'une famille de molécules. Ce type d'adsorbant est extrêmement spécifique aux composés étudiés et ne retient donc que très peu de matrice. Pour les hormones estrogéniques, la société PolyIntell commercialise des MIP spécifiquement conçues pour l'extraction de ces substances : AFFINIMIP[®]-Estrogènes (FS104-02).

Des tests préliminaires effectués en mode SPE ont démontré que ces cartouches étaient adaptées à l'extraction des molécules visées par cette étude et qu'elles engendraient beaucoup moins de bruit que les cartouches HLB[®]. Cependant, faute de temps, nous n'avons pas pu explorer plus en détails cette approche.

7. CONCLUSION

Le but de cette étude était d'obtenir une méthode qui pourrait permettre la mesure des hormones estrogéniques aux concentrations correspondant aux normes de qualité environnementale de la DCE, soit respectivement de 400 pg/L pour le 17-bêta-estradiol et 35 pg/L pour le 17-alpha-éthinyloestradiol dans la fraction dissoute d'une eau de surface. L'étude du diclofénac a été ajoutée car il fait partie de la liste complémentaire (« watch list ») de la DCE. D'autres hormones estrogéniques d'intérêts et l'ibuprofène ont également été inclus. Une méthode a d'abord été développée en extraction sur phase solide en ligne. Le test de différentes cartouches a permis d'établir que le support HLB® était le plus adapté à l'analyse des composés visés.

Avec ce mode d'analyse, la méthode chromatographique a dû être adaptée notamment pour obtenir la séparation entre le 17-alpha-estradiol et le 17-bêta-estradiol. Il a été vérifié que le pH de l'eau est particulièrement important pour l'analyse de composés comportant des groupements ionisables (en particulier les fonctions acides pour le diclofénac et l'ibuprofène).

Les capacités d'extraction et de rétention de la cartouche SPE-OL ont été déterminées en eau d'Evian® en fonction des volumes injectés et du pourcentage d'acétonitrile. Ainsi, un volume d'injection de 1500 µL avec un pourcentage d'acétonitrile de 10 % paraissait fournir un degré de robustesse suffisant pour éviter que les composés n'éluent à travers la cartouche.

Afin d'abaisser les limites de quantification, l'injection par SPE-OL couplée à la LC/MS/MS a été effectuée sur un extrait obtenu par le passage d'un large volume d'échantillon (1L) par extraction sur phase solide (SPE). Les tests ont d'abord été menés sur une matrice simple : de l'eau d'Evian®. Des limites de quantification très basses (~10 pg/L) n'ont pas pu être obtenues à cause du bruit de fond engendré en LC/MS/MS provenant des cartouches HLB®. L'optimisation du lavage préalable de la cartouche permettrait peut être de réduire le relargage induisant le bruit de fond. Des résultats encourageants ont été obtenus sur des concentrations à partir de 80 pg/L pour la plupart des hormones estrogéniques, le diclofénac et l'ibuprofène.

Concernant les résultats obtenus sur une matrice représentative d'une eau de surface, de l'eau de l'Oise, ils se sont avérés décevants. En effet, les effets de matrice sont plus prononcés avec ce milieu ce qui produit un bruit de fond important qui ne permet pas de mesurer les composés. Afin d'améliorer ce procédé, le bruit de fond doit impérativement être réduit. Plusieurs optiques peuvent être envisagées :

- Si, comme dans ce livrable, une phase identique pour l'extraction hors ligne et en ligne est utilisée, il semble indispensable de procéder à l'ajout d'une étape de purification après l'extraction hors ligne.
- Une plus grande sélectivité lors de la détection, par l'utilisation de spectrométrie de masse haute résolution, pourrait également réduire l'influence de la matrice.
- D'autres supports d'extraction pourraient être utilisés. L'utilisation d'adsorbant de type polymères à empreintes moléculaires (en SPE et/ou SPE-OL) permettrait peut-être d'apporter une sélectivité suffisante pour réduire considérablement les effets de matrices et les phénomènes de bruit de fond. Cette approche prometteuse pourrait être mise en œuvre lors d'un développement supplémentaire afin de pouvoir compléter les conclusions de cette étude.

Enfin, en perspective, cette approche d'associer l'injection par SPE en ligne à une autre technique préalable d'extraction pourrait être étendue. Ainsi, elle pourrait être appliquée après des procédés utilisés pour l'analyse de l'eau brute tels que les extractions liquide/liquide ou extractions par disque, pour se placer en conformité avec les exigences de la DCE.

8. REFERENCES

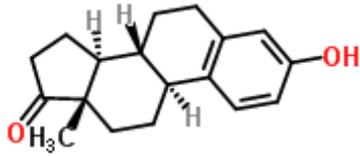
- [1] Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil de l'Union européenne du 23/10/2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau.
- [2] ANSES – Campagne nationale d'occurrence des résidus de médicaments dans les eaux destinées à la consommation humaine – 2011
- [3] Ministère de l'Ecologie, du développement durable, des transports et du logement- Plan national d'action contre la pollution des milieux aquatiques par les micropolluants pour la période 2010-2013, 2010
- [4] Ministère de l'Ecologie, du développement durable, des transports et du logement- Plan national sur les résidus de médicaments dans les eaux- 2011
- [5] Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy- 2013
- [6] Laboratoire national de référence pour la surveillance des milieux aquatiques (AQUAREF). Résultats de l'essai inter-laboratoires « résidus de médicaments dans les eaux », 2012
- [7] Laboratoire national de référence pour la surveillance des milieux aquatiques (AQUAREF). Fiche méthode MA12 – Hormones estrogéniques – méthode d'analyse dans les eaux –phase dissoute http://www.aquaref.fr/system/files/Fiche_MA12_-_Hormones_-_Eau__phase_dissoute_12-10-09-2.pdf
- [8] Miège C., Bados P., Brosse C., Coquery M., Method validation for the analysis of estrogens (including conjugated compounds) in aqueous matrices, TrAC Trends in Analytical Chemistry 28 (2009) 237-244
- [9] Guo F., Liu Q., Qu G., Song S., Sun J., Shi J., Jiang G., Simultaneous determination of five estrogens and four androgens in water samples by online solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A 1281 (2013) 9-18
- [10] Rodriguez-Mozaz S., de Alda M.J.L., Barcelo D., Picogram per liter level determination of estrogens in natural waters and waterworks by a fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method, Analytical Chemistry 76 (2004) 6998-7006
- [11] de Alda M.J.L., Barcelo D., Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection, Journal of Chromatography A 911 (2001) 203-210
- [12] Salvador A., Moretton C., Piram A., Faure R., On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants, Journal of Chromatography A 1145 (2007) 102-109
- [13] Wang S., Huang W., Fang G., He J., Zhang Y., On-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment, Analytica Chimica Acta 606 (2008) 194-201
- [14] Viglino L., Aboufadi K., Prevost M., Sauvé S., Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS, Talanta 76 (2008)1088-1096
- [15] XP T90-223 ; Qualité de l'eau - Dosage de certains résidus médicamenteux dans la fraction dissoute des eaux - Méthode par extraction en phase solide et analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) – 2013.

9. LISTE DES ANNEXES

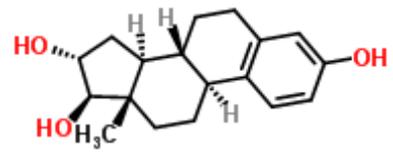
Repère	Désignation	Nombre de pages
Annexe 1	Structure des composés étudiés	1
Annexe 2	Paramètres de réglage du spectromètre de masse	1
Annexe 3-a	Méthode chromatographique en injection liquide	1
Annexe 3-b	Méthode chromatographique avec préconcentration SPE en ligne	2
Annexe 4	Chromatogramme obtenu sur la colonne X-Bridge™ 2,1x150 mm ; 3,5 µm (Waters®)	1
Annexe 5	Chromatogramme obtenu sur la colonne Kinetex® C ₁₈ 2,1x100 mm ; 2,6 µm (Phenomenex®)	1
Annexe 6	Chromatogramme obtenu avec l'injection des composés dans de l'eau MillQ ou d'Evian® dans les différentes cartouches SPE-OL testées	5
Annexe 7	Profil du log D vs. pH pour l'ibuprofène	1
Annexe 8	Méthode d'extraction des résidus médicamenteux par SPE-HLB® - (6cc-200mg)	1

ANNEXE 1

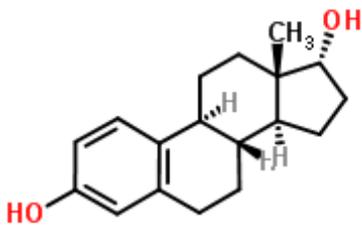
Structure des composés étudiés



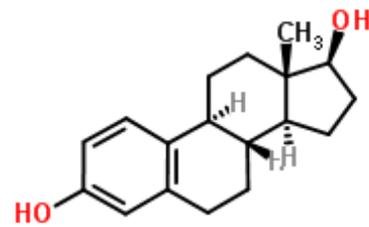
Estrone (E1) (M= 270 g/mol)



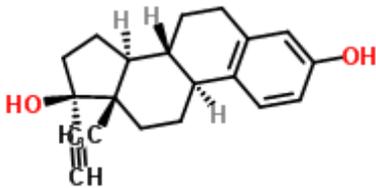
Estriol (E3) (M= 288 g/mol)



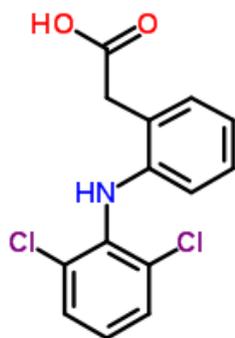
17-alpha-estradiol (17a-E2) (M= 272 g/mol)



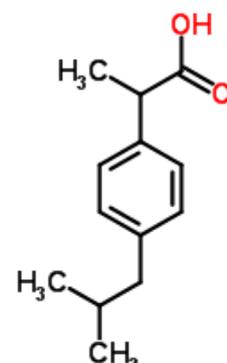
17-bêta-estradiol (17b-E2) (M= 272 g/mol)



17-alpha-éthynylestradiol (EE2) (M=296 g/mol)



Diclofénac (M=296 g/mol)



Ibuprofène (M=206 g/mol)

ANNEXE 2

Paramètres de réglage du spectromètre de masse triple quadripôle

- Tune

1. Mode d'ionisation : ESI(-),
2. Tension du capillaire : 3 kV,
3. Température de la source : 150° C,
4. Température du gaz de désolvatation (N2) : 400° C,
5. Débit en gaz de désolvatation (N2) : 800 L/h,
6. Débit en gaz rideau (N2) : 50 L/h,
7. Mode d'acquisition : MRM (Multiple Reaction Monitoring),
8. Débit en gaz de collision (Argon) : 0,17 mL/min.

- Fonctions MRM

Tableau 13 : Fonction MRM

Composés	Ions précurseurs (m/z)	Transitions	D.t. ^c (s)	T.C. ^d (V)	E.C. ^e (eV)
17-bêta-estradiol	271,2	271,2 - 145,0 ^a	0,100	64	39
	271,2	271,2 - 183,1 ^b	0,100	64	41
17-alpha-estradiol	271,2	271,2 - 145,0 ^a	0,100	64	39
	271,2	271,2 - 183,1 ^b	0,100	64	41
17-bêta-estradiol- ¹³ C ₂	273,2	273,2 - 147,0	0,100	64	40
17-alpha-éthynilestradiol	295,2	295,2 - 145,0 ^a	0,100	67	39
	295,2	295,2 - 159,1 ^b	0,100	67	35
17-alpha-éthynilestradiol- ¹³ C ₂	297,2	297,2 - 145,0	0,100	67	39
Estriol	287,2	287,2 - 171,0 ^a	0,100	70	36
	287,2	287,2 - 145,1 ^b	0,100	70	40
Diclofénac	294,05	294,1 - 250,0 ^a	0,100	21	11
	294,05	294,1 - 214,1 ^b	0,100	20	20
Diclofénac - ¹³ C ₆	300,05	300,1 - 256,0	0,100	20	11
Ibuprofène	205,1	205,1 - 161,1 ^a	0,100	22	7
Ibuprofène-d ₃	208,0	208,0 - 164,1	0,100	24	7
Estrone	269,1	269, - 145,0 ^a	0,100	69	34
	269,1	269,1 - 143,0 ^b	0,100	69	55
Estrone- ¹³ C ₂	271,1	271,1 - 147,0	0,100	69	34

^a Transition de quantification,

^b Transition de confirmation,

^c Dwell time,

^d Tension de cône,

^e Energie de collision.

ANNEXE 3-a

Méthode chromatographique avec injection liquide

Conditions chromatographiques :

- **Pompe quaternaire Acquity UPLC QSM - Waters**

Les conditions de gradient de la pompe sont les suivantes :

Tableau 14 : Gradient d'élution chromatographique

Temps (min)	Débit (mL/min)	Voie A (Acétonitrile)	Voie D2 (Eau)
Initial	0,2	40	60
2,00	0,2	40	60
4,50	0,2	80	20
7,00	0,2	80	20
8,25	0,2	95	5
9,50	0,2	95	5
10,00	0,2	40	60
15,00	0,2	40	60

- **Passeur Acquity UPLC Sample Manager - Waters**

Aiguille de 15 µl, volume injecté de 10 µl.

Solvant de purge : H₂O/MeOH 50 :50.

Solvant de lavage : H₂O/MeOH 50 :50 (lavage avant et après injection pendant 15 s).

Echantillons réfrigérés à +4°C.

- **Four : Acquity UPLC Column Manager- Waters**

La température du four est réglée à 30°C.

Colonne : Kinetex® C18 ; 2,6 µm, 100 X 2,1 mm ; Phenomenex (00D-4462-AN).

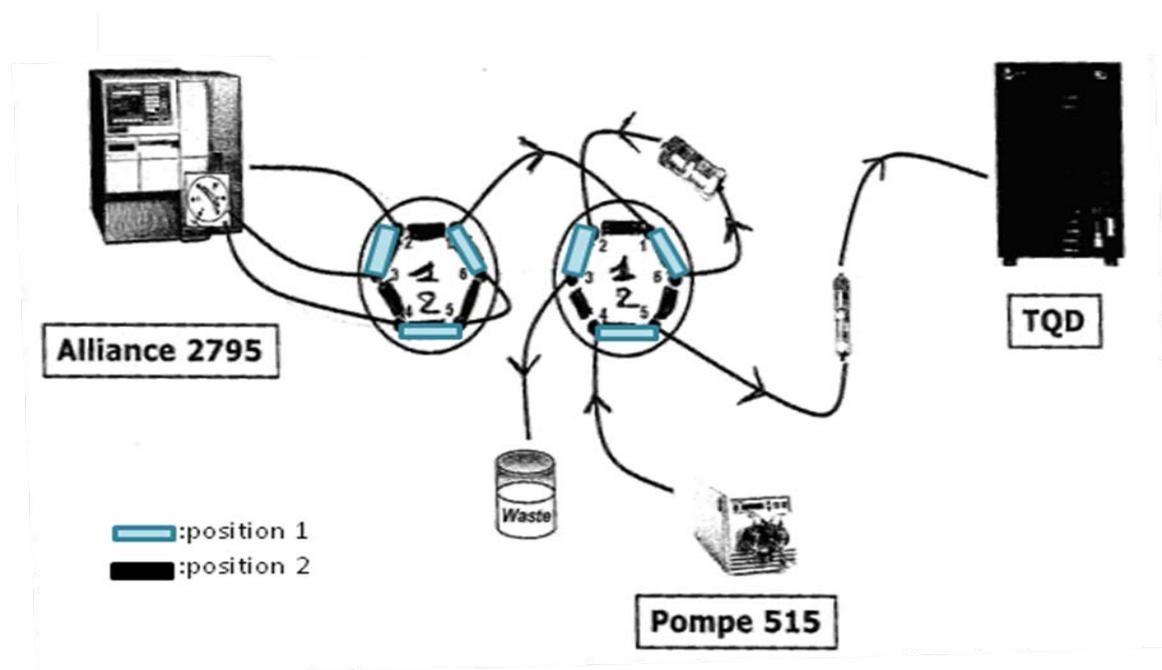
ANNEXE 3-b

Méthode chromatographique avec pré-concentration SPE en ligne

Fonctionnement du système SPE en ligne

En position 1 (vannes avec section bleu clair sur le schéma en annexe 4), l'échantillon est transféré sur la cartouche SPE. Avec le système utilisé, un volume de 1,5 mL (correspondant au volume d'un flacon) était échantillonné. Le volume normal d'injection en mesure directe (sans SPE en ligne) était de 10 µl. Une pré-concentration d'un facteur 150 est donc obtenue par ce biais par rapport à une injection sans SPE en ligne. Pendant le temps du chargement, la colonne chromatographique est équilibrée aux conditions initiales de phase mobile par la pompe additionnelle.

En position 2 (vannes avec section noire), les 2 vannes basculent simultanément. La pompe du système chromatographique est directement reliée à la cartouche SPE et élue les composés piégés en backflush, en fonction du gradient, directement vers la colonne chromatographique.



PS : Le four a été omis sur ce dessin. Dans le montage expérimental, la colonne chromatographique est placée dans le four réglé en température à 30°C.

Colonne SPE : voir partie optimization

Volume d'injection dans la colonne SPE : 1,5mL

Colonne analytique: Kinetex® C₁₈ ; 2,6 µm, 100 X 2,1 mm ; Phenomenex (00D-4462-AN).

Débit : 0,2 mL/min (lorsque la colonne analytique est présente sur le parcours d'élution) °

Phases mobiles d'élution de la colonne analytique:

Solvant : Acétonitrile

Phase Aqueuse : Eau

Phase aqueuse de chargement : Eau

Température du four où se trouve la colonne analytique: 30°C

Gradients:

Tableau 15. Gradient chromatographique avec injection SPE et méthode de lavage par acétonitrile

Temps en min.	Eau (voie A)	Acétonitrile (voie B)	Eau (voie C)	Débit du système 2795 Waters® (ml/min)	Position du système SPE	Pompe 515(3)
0	100%			2	1(1)	Marche
2	100%			2	1(1)	Marche
2,1	100%			0,2	1(1)	Marche
2,2		40%	60%	0,2	1(1)	Marche
2,8		40%	60%	0,2	2(2)	Marche
3,0		40%	60%	0,2	2(2)	Arrêt
6,7		60%	40%	0,2	2(2)	Arrêt
9,0		60%	40%	0,2	2(2)	Arrêt
10,5		95%	5%	0,2	2(2)	Arrêt
14,8		95%	5%	0,2	2(2)	Arrêt
15,0		40%	60%	0,2	2(2)	Arrêt
17,8		40%	60%	0,2	2(2)	Marche
18,0		40%	60%	0,2	1(1)	Marche
18,1	100%			0,2	1(1)	Marche
20,0	100%			2,0	1(1)	Marche
23,0	100%			2,0	1(1)	Marche

En position 1 (relay fermé, en OFF) = Chargement de la cartouche SPE.

Pompe 515 en série avec la colonne analytique vers le TQD.

Système Waters 2795 : la pompe élue en série sur la boucle d'injection et la cartouche SPE, l'éluat va vers la poubelle.

En position 2 (relay ouvert, en ON)= Elution de la cartouche SPE et chromatographie sur la colonne analytique.

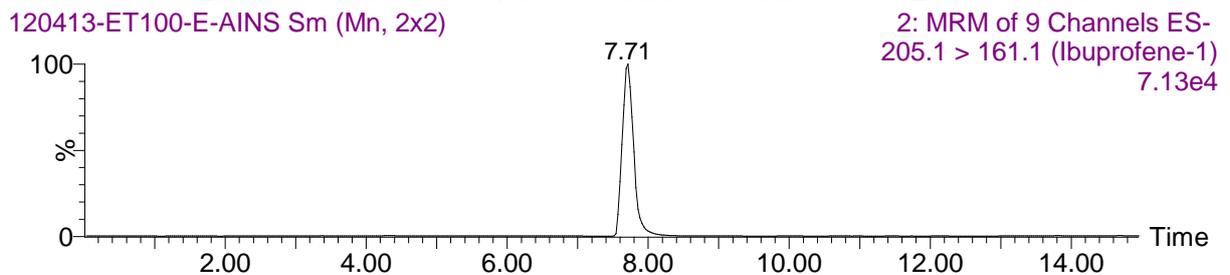
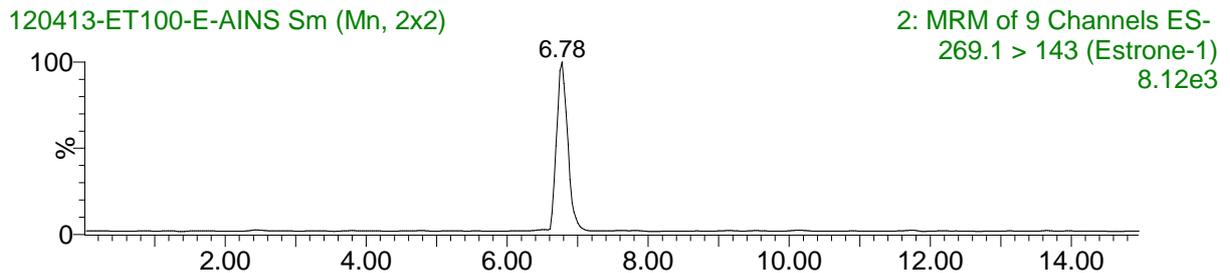
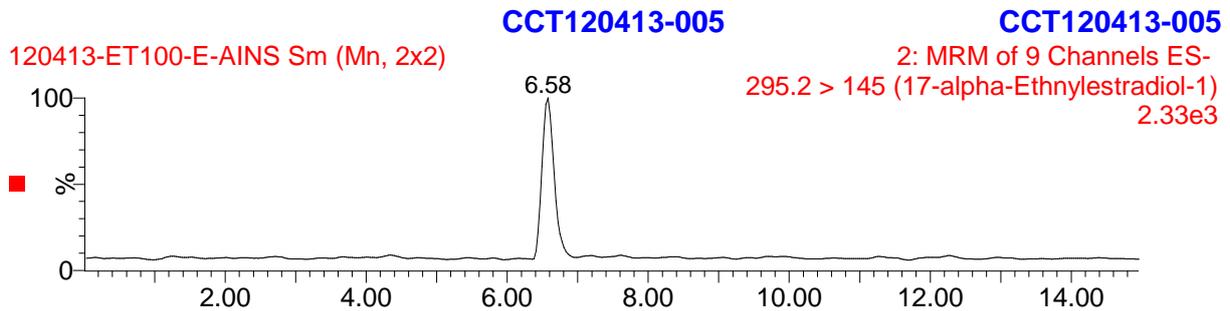
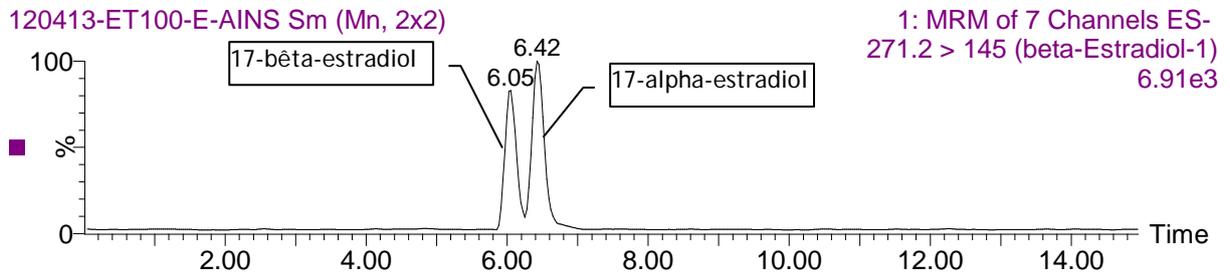
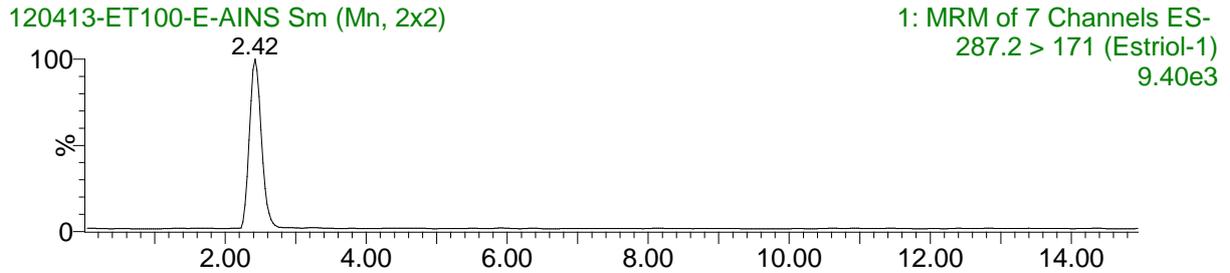
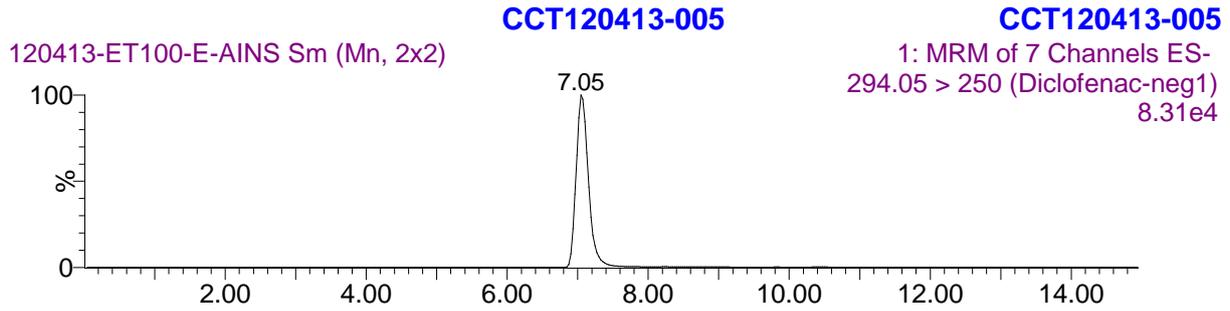
Pompe 515 en direct sur la poubelle.

Système Waters 2795 : la pompe élue en série la cartouche SPE, la colonne analytique, l'éluat va vers le TQD.

Pompe 515 qui alimente à 0,2ml/min avec un mélange 40% eau et 60% acétonitrile. Lorsque la pompe est en marche le relay est fermé (en OFF), lorsque la pompe est à l'arrêt, le relay est ouvert (en ON).

ANNEXE 4

**Chromatogramme obtenu sur la colonne X-Bridge™
2,1x150 mm ; 3,5 µm (Waters®)**



ANNEXE 5

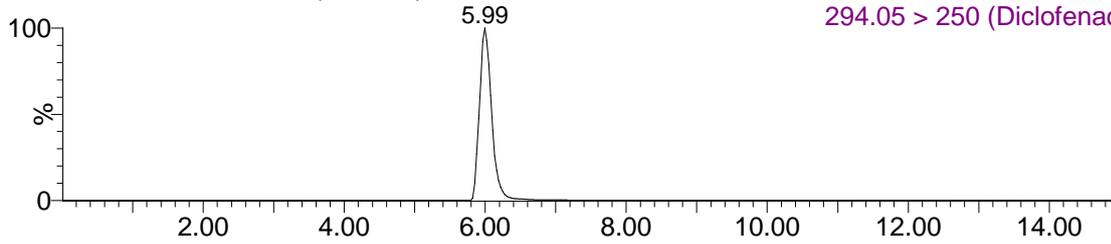
**Chromatogramme obtenu sur la colonne Kinetex® C18
2,1x100 mm ; 2,6 µm (Phenomenex®)**

CCT230413-007

CCT230413-007

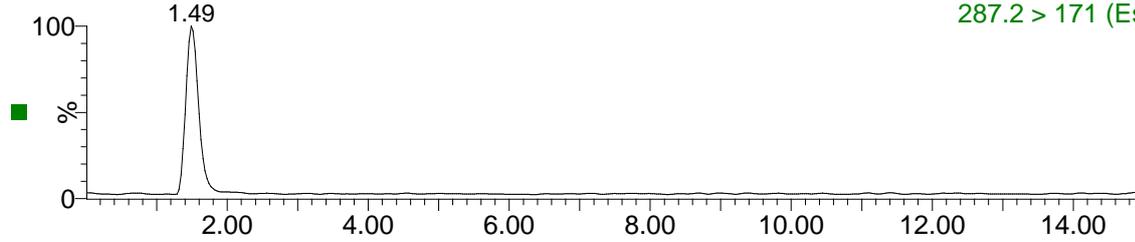
230413-ET100-E-AINS Sm (Mn, 2x2)

1: MRM of 7 Channels ES-
294.05 > 250 (Diclofenac-neg1)
1.46e5



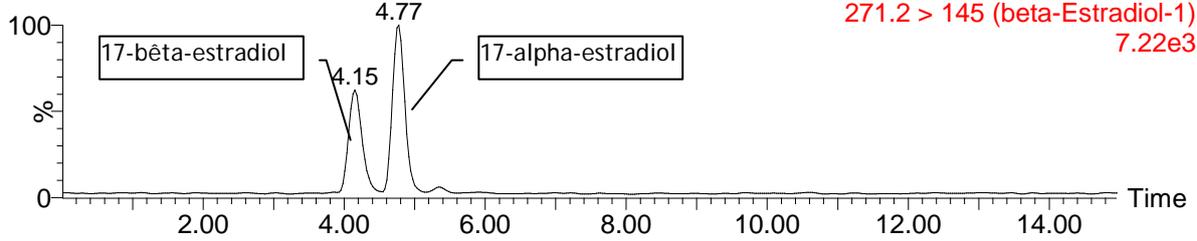
230413-ET100-E-AINS Sm (Mn, 2x2)

1: MRM of 7 Channels ES-
287.2 > 171 (Estriol-1)
6.52e3



230413-ET100-E-AINS Sm (Mn, 2x2)

1: MRM of 7 Channels ES-
271.2 > 145 (beta-Estradiol-1)
7.22e3

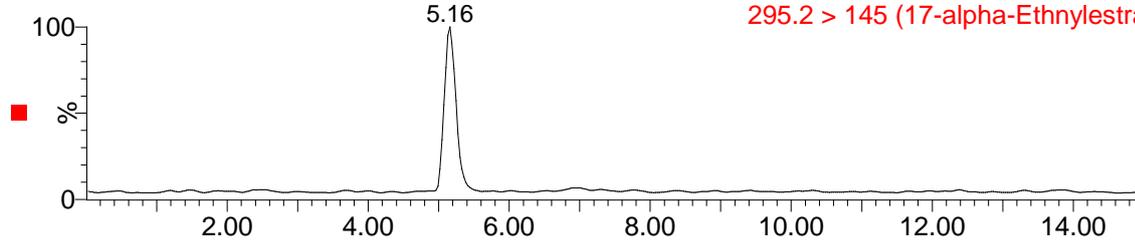


CCT230413-007

CCT230413-007

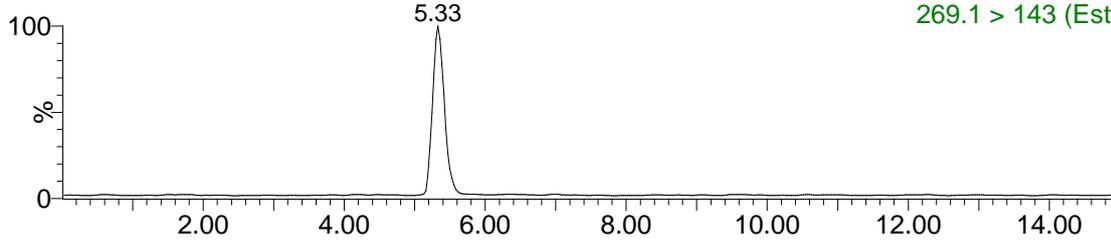
230413-ET100-E-AINS Sm (Mn, 2x2)

2: MRM of 9 Channels ES-
295.2 > 145 (17-alpha-Ethnylestradiol-1)
3.87e3



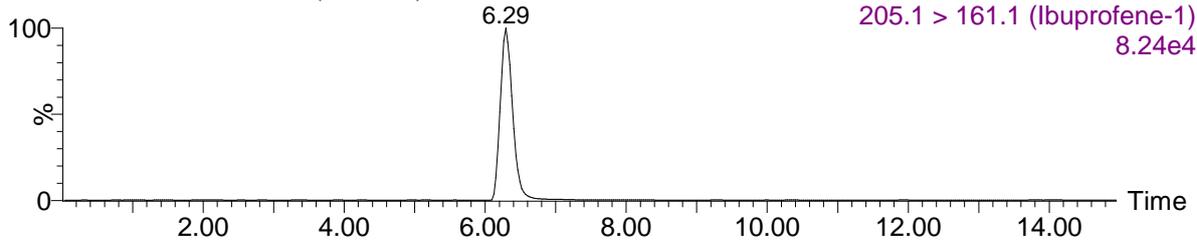
230413-ET100-E-AINS Sm (Mn, 2x2)

2: MRM of 9 Channels ES-
269.1 > 143 (Estrone-1)
9.08e3



230413-ET100-E-AINS Sm (Mn, 2x2)

2: MRM of 9 Channels ES-
205.1 > 161.1 (Ibuprofene-1)
8.24e4



ANNEXE 6

**Chromatogramme obtenu avec l'injection des composés
dans de l'eau MilliQ ou d'Evian® dans les différentes
cartouches SPE-OL testées**

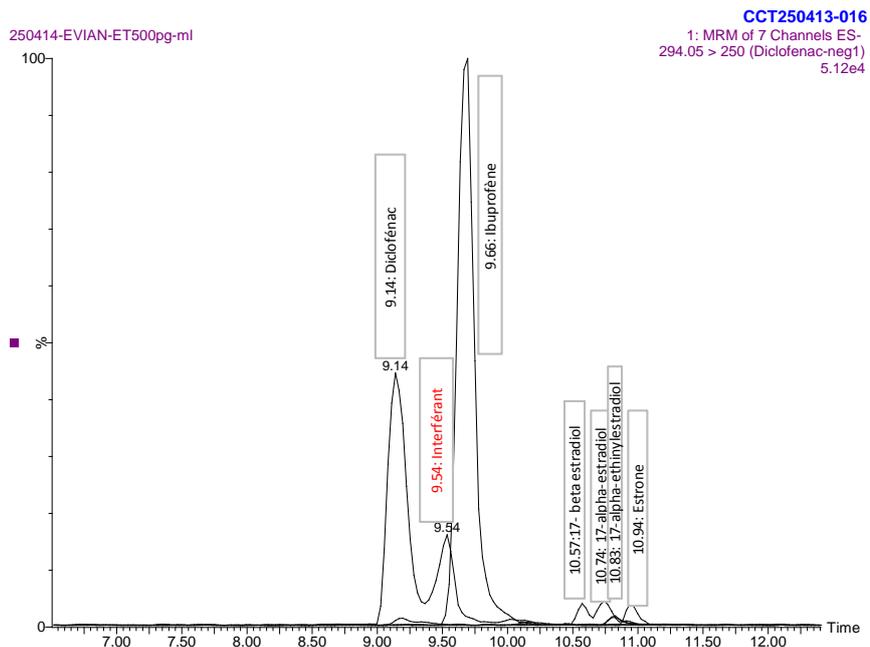


Figure 20: Chromatogramme d'un étalon à 500 ng/L d'eau d'Evian® en SPE-OL sur Lichrospher®-RP8 (superposition des MRM)

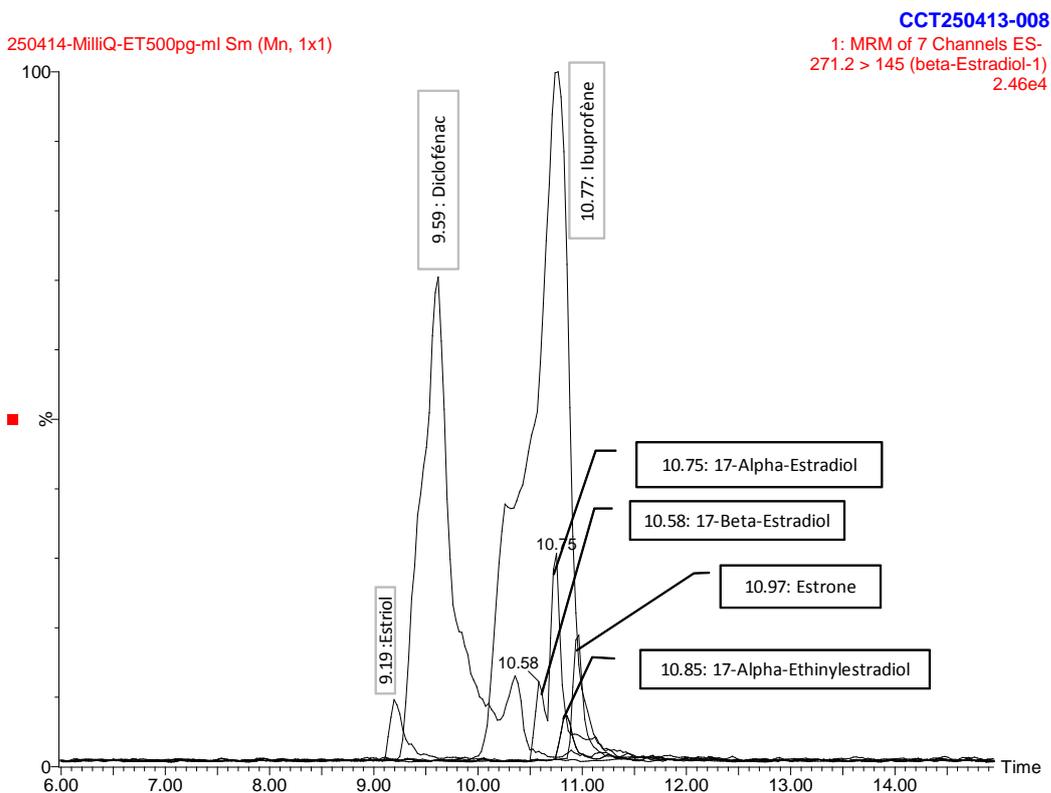


Figure 21 : : Chromatogramme d'un étalon à 500 ng/L d'eau Milli-Q en SPE-OL sur Lichrospher®-RP8 (superposition des MRM)

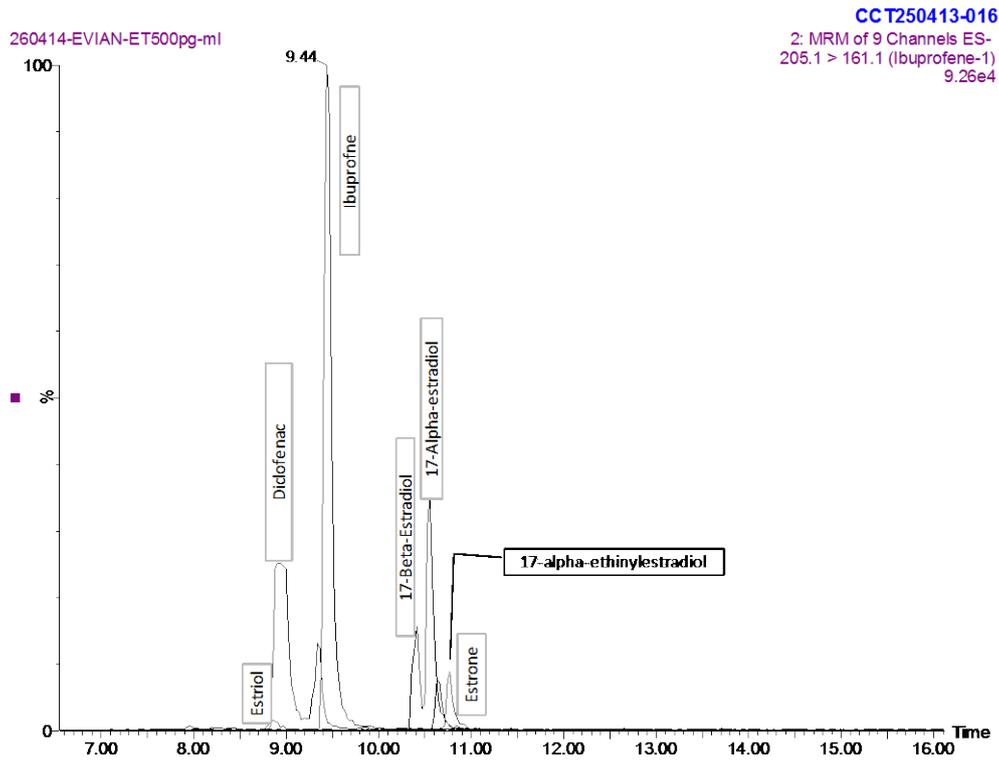


Figure 22: Chromatogramme d'un étalon à 500 ng/L d'eau Evian® en SPE-OL sur HLB® (superposition des MRM)

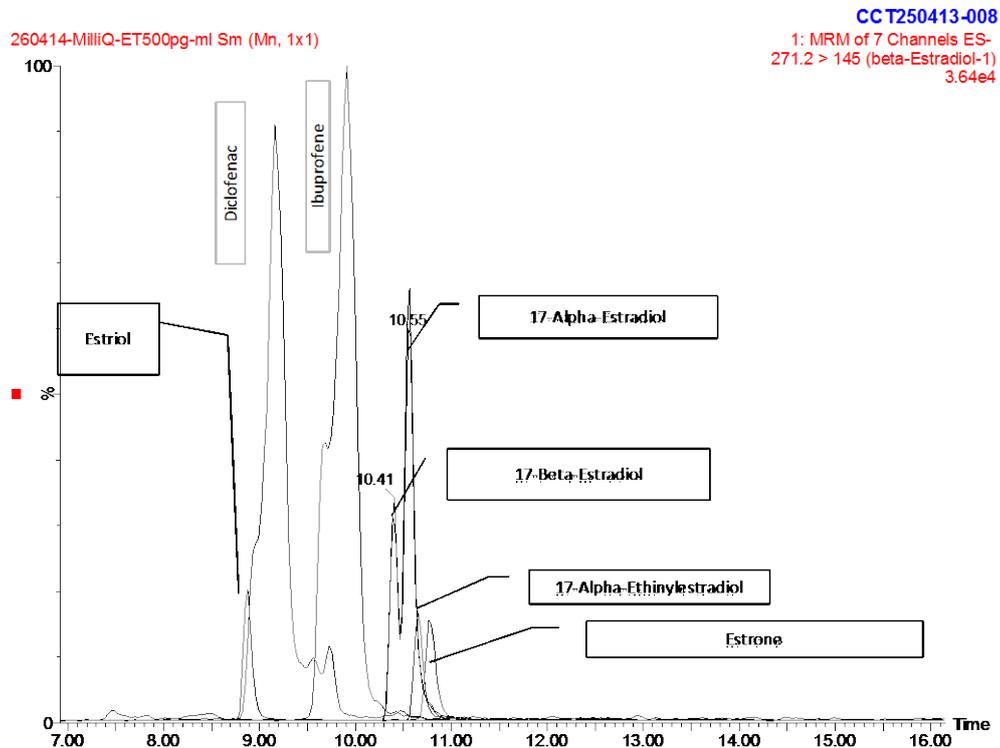


Figure 23: Chromatogramme d'un étalon à 500 ng/L d'eau Milli-Q en SPE-OL sur HLB® (superposition des MRM)

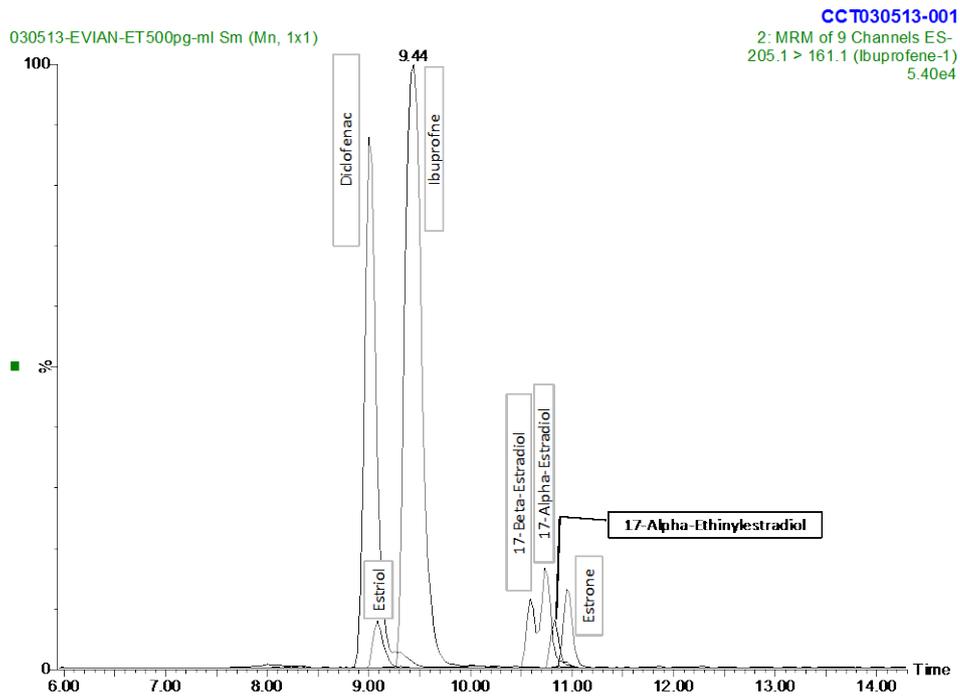


Figure 24: Chromatogramme d'un étalon à 500 ng/L d'eau Evian® en SPE-OL sur Polyclean™302H (superposition des MRM)

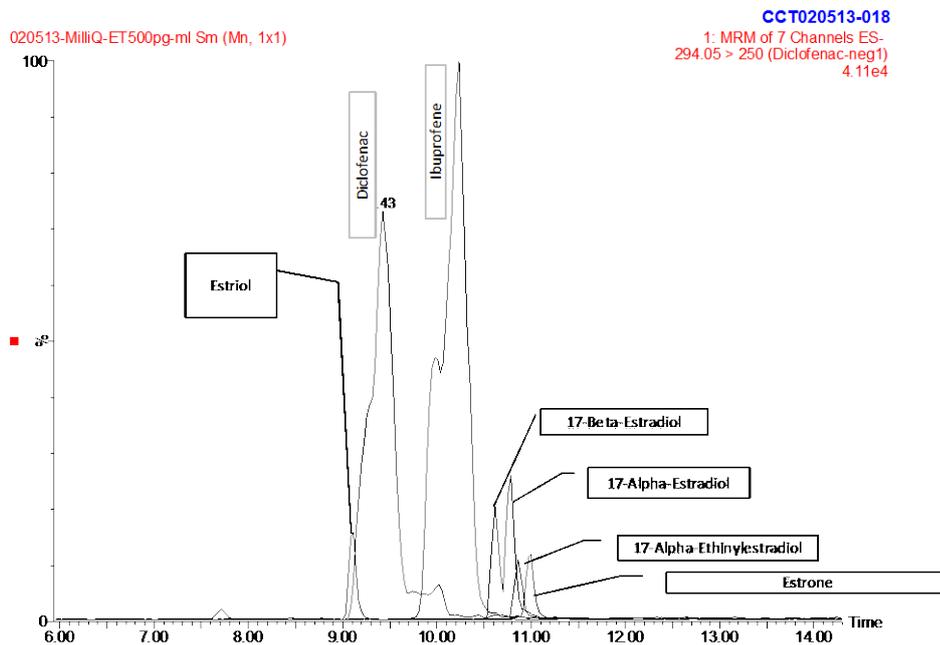


Figure 25: Chromatogramme d'un étalon à 500 ng/L d'eau Milli-Q en SPE-OL sur Polyclean™302H (superposition des MRM)

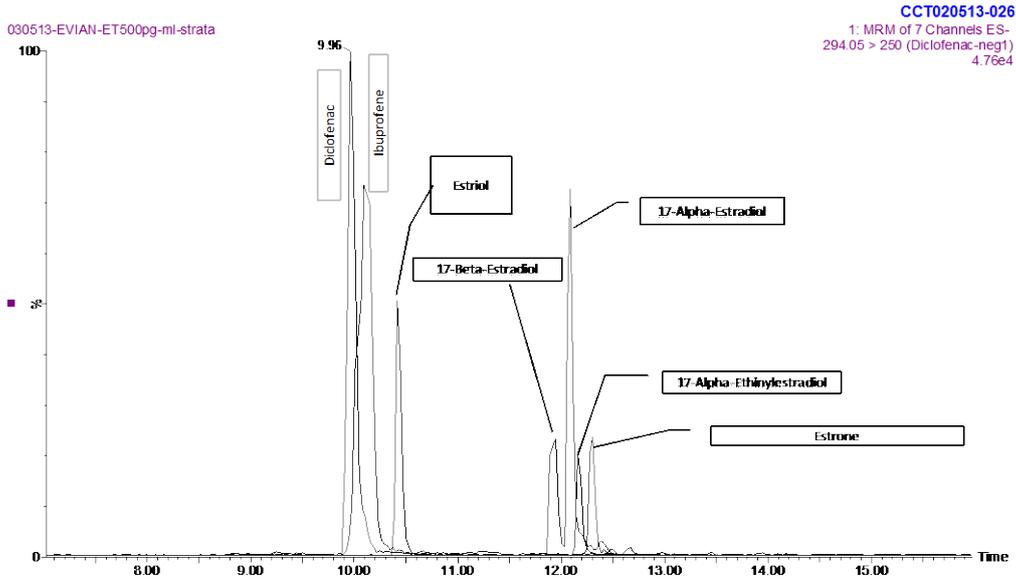


Figure 26: Chromatogramme d'un étalon à 500 ng/L d'eau Evian® en SPE-OL sur Synergi™-Fusion RP8 (superposition des MRM)

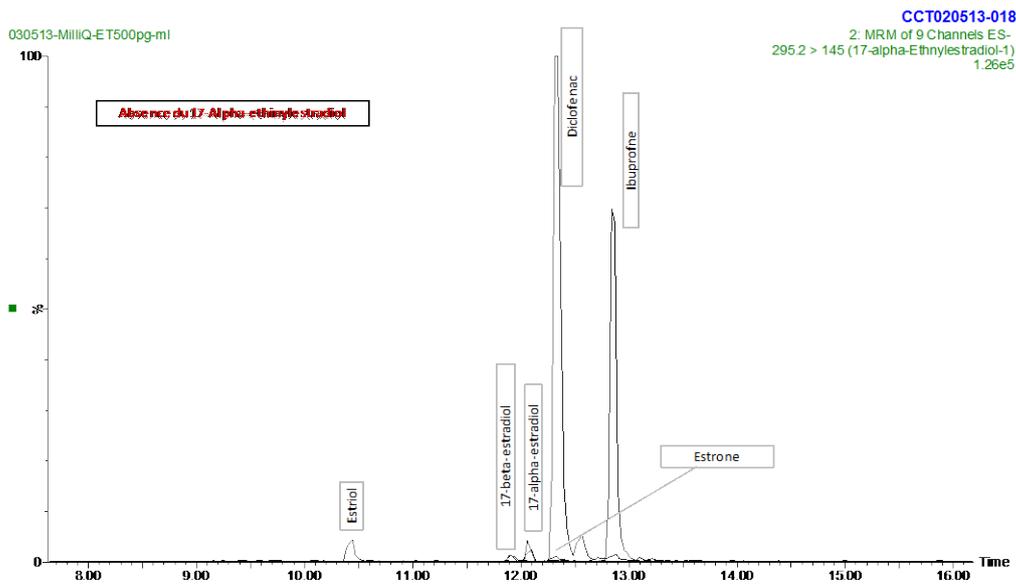


Figure 27: Chromatogramme d'un étalon à 500 ng/L d'eau Milli-Q en SPE-OL sur Synergi™-Fusion RP (superposition des MRM)

ANNEXE 7

Profil du log D vs. pH pour l'ibuprofène

Ibuprofène

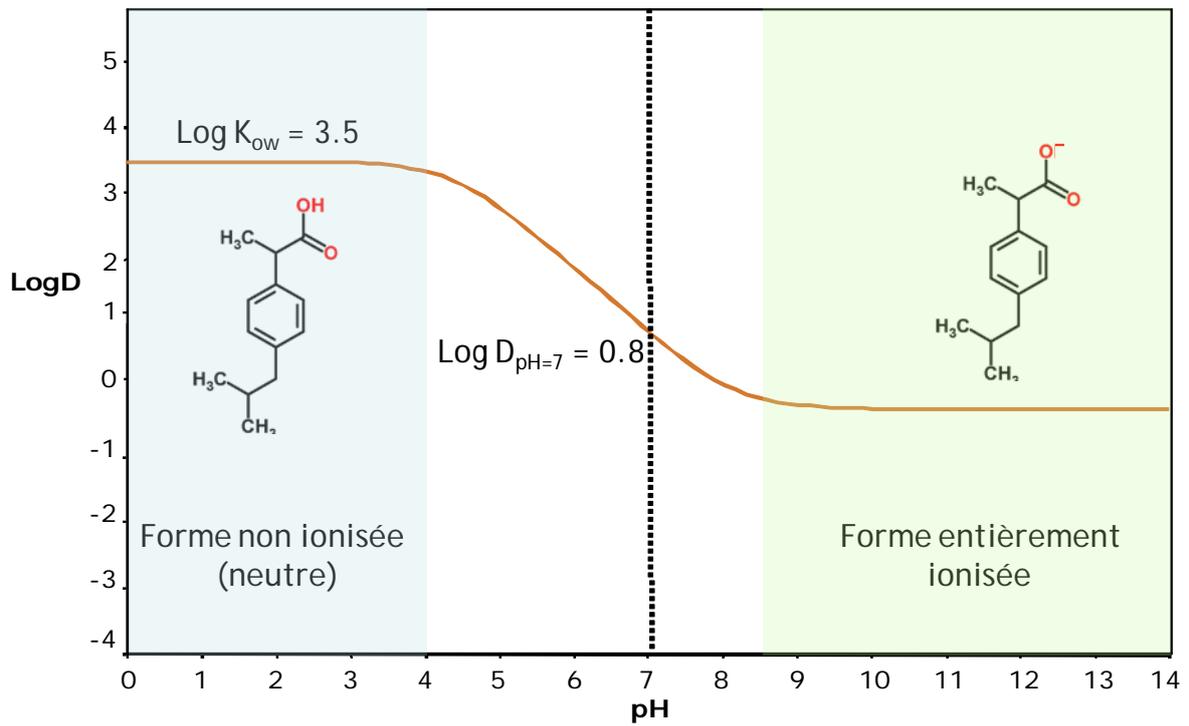


Figure 28 : Profil du log D vs. pH pour l'ibuprofène

ANNEXE 8

**Méthode d'extraction des résidus médicamenteux par
SPE-HLB® - (6cc-200mg)**

Etape	Solvants	Volume (mL)	Débit (mL/min)	Observation
Conditionnement	Méthanol	12	20	
Conditionnement	Eau à pH=2	12	20	
Chargement	Echantillon à pH=2	1000	20	
Lavage	Eau à pH=2	6	6	
Poussée pour vidange				2 mL d'air à 3 mL/min.
Séchage				Azote à 3,5 bar pendant 20 min
Elution 1	Méthanol	2	1	Récupérés dans le même tube
Elution 2	Méthanol	2	1	
Elution 3	Méthanol	2	1	